UNIVERSITARIA
Andrei C. Miu
Adrian I. Olteanu
De la mecanisme moleculare şi celulare la comportament şi evoluţie
Vol I: Dezvoltarea sistemului nervos
DACIA
ANDREI C. MIU, ADRIAN I. OLTEANU
NEUROŞTIINŢE
De la mecanisme moleculare şi celulare la comportament şi evoluţie
Colecţia: *Universitaria* Seria: *Esculap*
Coperta: Diana Racu
Imagine copertă: *Secţiune prin cortexul cerebral uman de la un nou-născut, la care, prin impregnare Golgi, se poate observa un neuron piramidal. Una din primele secţiuni ale lui S. Ramón y Cajal şi, odată cu ea, începutul neuroştiinţelor moderne.*
612.8
Descrierea CIP a Bibliotecii Naţionale a României MIU, ANDREI
Neuroştiinţe: de la mecanisme moleculare şi celulare la comportament şi evoluţie / Andrei C. Miu, Adrian I. Olteanu.
— Cluj-Napoca: Dacia, 2002.324 p.; 16, 5 x23, 5 cm. – (Universitaria. Seria Esculap) ISBN 973 – 35 – 1537-X
Vol I2002 324 p – ISBN 973 – 35 – 1538 01508 I. Olteanu, Adrian
© **Editura Dacia**
Cluj-Napoca www.editura Dacia.ro
Satu Mare www.multiarea.ro

ANDREI C. MIU
ADRIAN I. OLTEANU
NEUROŞTIINŢE
De la mecanisme moleculare şi celulare la comportament şi evoluţie
EDITURA DACIA Cluj-Napoca
Bunicilor mei, Georgeta şi Ştefan Popa.

Cu toată iubirea şi recunoştinţa de care sunt capabil.
(A. C. M.)

Autori:
ANDREI C. **MIU**
Facultatea de Psihologie şi Ştiinţele Educaţiei
Universitatea **„Babeş-Bolyai”.**
Cluj-Napoca, 3400 **Cluj**
ROMÂNIA
ADRIAN I. OLTEANU
Catedra de Fiziologie Facultatea de Medicină
Universitatea de Medicină şi Farmacie „Iuliu Haţieganu” Cluj-Napoca, 3400 Cluj ROMÂNIA

CUPRINS

Foreword (lb. engleză)
Prefaţă (lb. română)
Cuvânt înainte
Listă de abrevieri
Cap. 1 NEUROŞTIINŢE. ISTORIA CONCEPŢIILOR ŞI A PROGRAMELOR DE CERCETARE DESPRE CREIER
1.1 Progresul timpuriu al neuroştiinţelor a fost guvernat de metode 3
1.2 Teoria neuronului şi cei trei mari: Ramón y Cajal, Golgi şi Marinescu 7
1.3 Formarea neuroştiinţelor şi primele programe de cercetare 11
1.4 Neuroştiinţele cognitive şi neuroimagistica funcţională 14
1.5 Genomică, neuroembriologia moleculară şi neurobiologia evoluţionistă: Triada imperială i 7
1.6 Rezumat 19
Cap. 2 MORFOGENEZA ŞI **REGIONALIZAREA** TIMPURIE A SISTEMULUI NERVOS
2.1 Organizarea axială şi inducţia neurală. Neurulaţia
2.1.1 Mecanisme moleculare care contribuie la inducţia neurală
2.1.2 Rolul plăcii precordale şi norocordului în inducţia neurală
2.1.3 Conferirea caracterului dorso-ventral în tubul neural
2.2 Organizatorul istmic: Morfogeneza mezencefalului, rombencefalul îi şi cerebelului
2.2.1 Morfogeneza cerebelului

2.3 Morfogeneza timpurie şi regionalizarea măduvei spinării. Morfogeneza timpurie a sistemului nervos periferic
2.3.1 Morfogeneza crestelor neurale
2.3.2 Pâacodele neurogenice
2.4 Morfogeneza prozencefalului
2.4.1 Morfogeneza telencefalului
2.5 Reglarea genetică a adeziunii celulare: interfaţa molecular-celular în morfogeneză
2.6 Rezumat
***ŢI* 78 82**
86
Cap. 3 SPECIFICAREA ARIILOR **CORTICALE. NEUROGENEZA** ŞI MIGRAREA NEURONALĂ 113
3.1 Neurogeneza, migrarea neuronală şi dezvoltarea corticală 115
3.2 Formarea hărţii funcţionale a cortexului cerebral 134
3.2.1 Factori intrinseci în regionalizarea cortexului cerebral 135
3.2.2 Contribuţia aferentelor talamocorticale la regionalizarea cortexului cerebral 138
III
3.3 Neurogeneza în creierul adult. Precursorii neuronali şi terapia celulară 143
3.3.1 Celulele suşe 146
3.3.2 Proprietăţile celulelor suşe 163
3.3.3 Neuroregenerarea şi terapia celulară 168
3.4 Regulile vieţii şi ale morţii: senescenţa şi moartea celulară 173
3.4.1 Senescenţa celulară 178
3.5 Rezumat 179
Cap. 4 SINAPTOGENEZA. FORMAREA REŢELELOR NEURONALE ŞI A CIRCUITELOR NERVOASE 207
4.1 Densitatea sinaptică în diferite sisteme corticale 212
4.2 Unele diferenţe morfo-funcţionale între sinapse 217
4.3 Selecţia activă a sinapselor 219
4.3.1 Teorii ale specificităţii sinaptice 221
4.4 Dezvoltarea şi asamblarea sinapsei 225
4.4.1 Dezvoltarea conului de creştere 225

4.4.2 Dezvoltarea arborelui dendritic 229
4.4.3 Unele condiţii ale sinaptogenezei 232
4.5 Joncţiunile de tranzit (gap) şi activitatea electrică spontană 233
4.6 Mecanisme moleculare ale dezvoltării şi formării sinapsei 236
4.7 „Lanţul slăbiciunilor": de la comportament la sinapsă şi genom 241
4.7.1 Potenţarea de lungă durată 242
4.7.2 Semnalizarea sinapsă-nucleu 247
4.8 Rezumat 248
Cap.5 MIELINIZAREA ŞI MATURAREA CIRCUITELOR NERVOASE 267
5.1 Mielinizarea diferenţiată a creierului şi sistemului nervos periferic 269
5.2 Organizarea şi structura mielinei 273
5.3 Originea, diferenţierea şi migrarea celulelor secretoare de mielină 276
5.3.1 Stadiile mielinizării 279
5.3.2 Motilitatea şi migrarea progenitorilor celulelor secretoare de mielină 281
5.3.3 Geometria substanţei albe 282
5.3.4 Modificări ultrastructurale în axonul mielinizat 283
5.4 Factori care influenţează direct mielinizarea 285
5.5 Implicaţiile mielinizării pentru funcţionarea sistemului nervos 288
5.6 Rezumat 291
Sumar (lb. engleză) Index de termeni
303
317

IV

FOREWORD

I was kindly invited by Andrei C. Miu and Adrian I. Olteanu to write a forewordfor their work on ***The Development of the NervousSistem*** *(volume I of a treatise on* ***Neurosciences. From Molecular and Celular Mechanisms to Behavior and Evolution****). This task I accepted with pleasure due to my sympathy with the approach chosen by the authors and my conviction that students of muroscience*

under every aspect (molecular, celular, biological, psychological, medical, or educaţional) need this sort of approach tojump upon the shoulders of 21 „century neuroscientists (se to speak) and visualize optimally the terrain that waits to be explored.

Indeed, independently of what may be seen as finisecular editorial recapitulative efforts – i.e., various books and atlases recently published, aiming to collect and sistematize the vast amount of neurobiological knowledge accumulated during the postwar period –, singular advances în molecular biology have led to much better access to genomic information and gene functions in development, health and disease than was available before. This has caised the importance of a developmental molecular approach to heights unexpected ten years before. The new body of knowledge is quickly wedging its way into convenţional neuroscience, pervading it, and suggesting upon the changing background some new paradigms at all levels of analysis, that is, in the ways in which one visualizes ineaningful questkms and answers in thisfleld. I am persuaded that neuroscience, rather than having reached a status of relative completion, is în for substanţial reexamination of previous assumptions and postulation of many novei visions, conjectures and hypotheses în need of scientific testing. Many still hardly explored corners and nooks of the brain will be studied and become better understood under guidance of molecular characterization, and paralel causal and functional analyses. The bridge connecting neurobiological and neuropsychological fields of thought will expand and this will help the resolution of hitherto unassailable problems (e.g., education, or social violence).

In the pages of the present volume, and in the very conception of the treatise, starting se proeminently with developmental issues presented from a modern molecular viewpoint, the authors show they are fully conscious of this enciting panorama. There is an overt cum to enable the approach to higher level questkms (e. g... understanding psychology) by means of a clear view ofunderlying lower level mechanisms, notably those occurring during brain development. The essenţial neural developmental processes are focused sequentially in a way that respects thefield's history, but relentlessly centers the attention of the reader upon novei breakthroughs în molecular mechanisms, and, eventually, on the paradigm changes that need io be considered. The message comes across that we are b egining to understand the brain in

this way, no matter how much we / before, and the distinct perspectives for further advance and further e thinking will attraci the curiosity of many incipient neuroscientists. Ter neuroscience also ***will jind*** *this text inspir ing in their continuous effort **

V

their lecture notes. The explanatory boxes and references includea in the text are very usefulfor anyone wanting to expand into wider readings.

One can but congratulate the authors for this excellent contribution to the neuroscience literature, and learn from their example towards future additional efforts along this direction.

October, 2002

Luis ***Puelles***

Profesor of Neuroanatomy

Dept. Htiman **Anatomy,** Embryology and Psychobioiog; Faculty of Medicine Universtiv of Murcia (Spain.)

VI

PREFAŢA

Am fost invitat cu amabilitate de către Andrei C. Miu şi Adrian I. Olteanu să scriu o prefaţă pentru lucrarea lor despre Dezvoltarea sistemului nervos (volumul I al unui tratat de Neuroştiinţe. De la mecanisme moleculare şi celulare la comportament şi evoluţie). Am acceptat această sarcină cu plăcere datorită simpatiei mele pentru abordarea aleasă de autori şi datorită convingerii mele că cercetătorii oricărui aspect din neuroştiinţe (molecular, celular, biologic, psihologic, medical sau educaţional) au nevoie de acest tip de abordare pentru a putea privi peste umerii specialiştilor în neuroştiinţe din secolul 21 (ca să zicem [aşa) şi pentru a putea vedea cât mai bine terenul care îi aşteaptă pentru a fi explorat.

Într-adevăr, independent de ceea ce ar putea părea ca un efort editorial.

recapitulativ la sfârşit de secol – adică diverse cărţi şi atlase recent publicate, cu scopul de a strânge şi a sistematiza cantitatea mare de cunoştinţe de neurobiologie acumulată în timpul perioadei postbelice –, progrese unice în biologia moleculară au condus la un acces mult mai bun la informaţia genomică şi funcţiile genelor în dezvoltare, sănătate şi boală. Aceasta a crescut importanţa abordării moleculare a dezvoltării până la înălţimi neaşteptate acum zece ani. Noul corp de cunoştinţe îşi

face rapid drum în neuroştiinţa contemporană, integrându-se şi sugerând schimbarea unor noi paradigme la toate nivelurile de analiză, adică a căilor în mare oricine percepe întrebările şi răspunsurile semnificative din acest domeniu.

Sunt convins că neuroştiinţa, decât să credem că a ajuns la o stare de împlinire relativă, se găseşte în situaţia unei reexaminări substanţiale a unor asumpţii anterioare şi a postulării unor numeroase perspective, conjecturi şi ipoteze inovatoare care au nevoie de testare ştiinţifică. Multe aspecte ale creierului încă puţin explorate vor fi studiate şi vor deveni mai bine înţelese odată cu orientarea.

oferită de caracterizarea moleculară şi de analizele funcţionale şi cauzale paralele. Puntea ce conectează domeniile de studiu ale neurobiologiei şi neuropsihologiei se va extinde şi aceasta va facilita rezoluţia unor probleme până acum imposibil de evaluat (de exemplu, educaţia sau violenţa socială).

În paginile volumului de faţă şi chiar în concepţia tratatului ce începe atât de proeminent cu aspecte de dezvoltare prezentate dintr-o perspectivă moleculară modernă, autorii dovedesc că sunt complet conştienţi de această panoramă incitantă. Un scop explicit este de a permite abordarea unor probleme de la niveluri superioare (de pildă, înţelegerea psihologiei) prin intermediul unei perspective clare asupra mecanismelor subiacente de la niveluri inferioare, mai ales acelea ce intervin în timpul dezvoltării creierului. Abordarea se concentrează pe rând asupra proceselor principale de dezvoltare a sistemului nervos într-o manieră care respectă istoria acestui domeniu, dar focalizează fără întârziere atenţia cititorului asupra descoperirilor majore ale mecanismelor moleculare şi, în final, asupra schimbărilor de paradigmă ce trebuie să fie luate în considerare. Mesajul care rezultă este că de-abia începem să înţelegem creierul în acest fel, indiferent de cât de mult ştiam până acum şi că perspective clare pentru progrese

VII

şi concepţii creative viitoare vor atrage curiozitatea multor specialişti în neuroştiinţă aflaţi la începutul carierei. Profesorii de neuroştiinţă vor găsi, de asemenea, acest text ca foarte sugestiv în efortul lor de a îşi actualiza notele de curs. Casetele explicative şi referinţele incluse în text sunt foarte utile pentru oricine doreşte să îşi aprofundeze lectura.

Nu putem decât să îi felicităm pe autori pentru această excelentă

contribuţie la literatura de neuroştiinţă şi să învăţăm din exemplul lor pentru alte eforturi viitoare în această direcţie.

October, 2002

Luis Puelles

Profesor de Neuroanatomie

Catedra de Anatomie Umană, Embriologie şi Psihobiologie Facultate de Medicină Universitatea din Murcia (Spania)

VIII

CUVÂNT CĂTRE CITITOR

Acest volum a pornit de la ideea unei serii de tratate comprehensive care să reactualizeze, într-un chip cât mai informativ, bibliografia din neuroştiinţe. Prin comprehensiv, am înţeles că vrem să scriem un text fără pseudopode, pe care să îl citeşti fără să îţi aglomerezi biroul cu alte cărţi care să te lămurească mai bine. Iniţial, ne-am propus să ne concentrăm pe fundamente şi nu pe detalii, aceasta pentru că, scufundaţi zi de zi în literatura foarte recentă, atât din interes teoretic şi didactic, cât şi datorită constrângerilor cercetărilor noastre, am fost foarte conştienţi mai tot timpul că o sinteză extinsă, prea meticuloasă, ne-ar fi luat prea mult timp. Lucrul la acest text este foarte caracteristic şi pentru stilul cu care sunt obişnuiţi studenţii noştri, poate chiar cu stilul general, dificil, dar entuziast şi provocator, al ştiinţelor despre creier. Studenţii noştri vor zâmbi, poate. Vrem să spunem că, din selecţia detaliilor şi, implicit, a bibliografiei, a rezultat, totuşi, mai mult decât ne aşteptam. Ceea ce credeam că este un plan bun pentru un tom s-a transformat în primul volum al acestui tratat, concentrat pe dezvoltarea sistemului nervos. Ca orice scribi, ne cerem iertare în primul rând copacilor care au fost retezaţi ca să înfăţişeze cuvintele noastre.

Trebuie să avertizăm că această carte porneşte strict de la articole de cercetare fundamentală. De obicei, e preferabil să pleci de la texte de sinteză, de la care poţi prelua un stil sau chiar un punct de vedere. Nu e deloc neobişnuită această strategie şi e chiar eficientă. În cazul nostru, fără să spunem că e mai bine, am avut drept surse, de cele mai multe ori, articolele în care sunt prezentate rezultatele în forma tipică pentru texte de cercetare, cu material şi metodă şi însoţite de o discuţie scurtă. Nu spunem acest fapt ca să părem mai buni pentru că textul se supune oricum, în mod direct, judecăţii domniilor voastre. Însă avertismentul e util pentru a înţelege că această carte şi-a

căutat un stil printre stive de rezultate experimentale. Avantajul este că, de multe ori, ne-am ancorat în detalii, uneori, utile. Am avut şi ocazia să trimitem cititorul la sursele directe. Dezavantajele acestei strategii de documentare sunt numeroase. În primul rând, dincolo de lectura săptămânală a articolelor de interes care au apărut în jurnalele mari, am petrecut mai mult decât ne propusesem pentru documentare. Priza la fluxul de literatură a fost atât de puternică încât ne-a fost greu să ne apucăm să mai şi scriem. Totodată, suntem foarte conştienţi că, în timp ce scriem aceste rânduri şi mai târziu, când domniile voastre le veţi citi, literatura citată ar putea fi uşor suplimentată cu cercetările care au apărut în aceste săptămâni. Ne consolăm că am prezentat atât rezultatele clasice, care rareori se demonetizează, cât şi rezultate foarte recente, prea recente pentru a fi infirmate. Bibliografia este asigurată până la ultimele sinteze din domeniu. Şi nu o spunem de formă, ci garantăm, noi şi referenţii noştri, pentru aceasta.

Am făcut tot ce ne-a stat în putinţă ca textul să fie util. De aceea, am plasat în text unele casete explicative, cu referinţe separate, pentru cei care doresc să aprofundeze anumite aspecte care ne-au fost şi nouă la îndemână. Apoi, am adnotat bibliografia, acesta fiind un obicei al celui care citeşte texte ştiinţifice şi îşi face trimiteri explicative la fiecare referinţă pe care vrea apoi să o caute. Credem că

aceste note ar putea fi folositoare cititorilor şi, mai mult, ele corespund standardelor pe care le-au adoptat în ultimii ani jurnalele consacrate de sinteze ştiinţifice.

Reactualizarea bibliografiei nu se raportează în chip direct la alte lucrări scrise în limba română. Ne cerem scuze autorilor români merituoşi pe care nu i-am citat, dar ne pot găsi justificare în faptul că noi, ca şi ei, probabil, am pornit de la referinţele de cercetare originare. Pe de altă parte, ne-am confruntat cu problema traducerii unor termeni de specialitate din limba engleză. Am depăşit această problemă, dar s-ar putea să nu o fi rezolvat. Noi am preferat traducerea fonetică a unor termeni, de pildă, denumiri de molecule care sunt, de obicei, acronime ce nu pot fi traduse. Astfel, de exemplu, o moleculă numită *noggin* am tradus-o ca *noghină* în limba română. În acest sens, mulţumim domnişoarei Asistent Univ. Alina A. Miu (Universitatea din Piteşti) pentru răbdarea cu care ne-a oferit consiliere avizată. Oricum, fiecare termen a fost dezbătut, pornind de

la credinţa că nu avem voie să aglomerăm lexicul, fie el şi de specialitate, cu neologisme barbare. Sperăm că am reuşit să evităm acest lucru. Acolo unde am introdus sintagme alternative, ca în cazul sintagmei englezeşti *gap junction,* tradusă tradiţional că joncţiune de mare conductanţă sau joncţiune strânsă şi tradusă de noi ca *joncţiune de tranzit,* am beneficiat de sfatul unora dintre referenţii noştri străini, cu care am discutat sensul fundamental pe care trebuie să îl indice cât mai bine o sintagmă tradusă.

La această carte au contribuit în primul rând consultanţii noştri ştiinţifici: Lector drd. Oana Benga (Universitatea „Babeş-Bolyai", România), Profesor Claude Desplan (New York University, Statele Unite), Profesor Barbara L. Finlay (Cornell University, Statele Unite), Profesor Anthony H. Futerman (Weizmann Institute of Science, Israel), Profesor Alexandra L. Joyner (Howard Hughes Medical Institute şi Skirball Institute of Biomoiecuiar Medicine, New York University, Statele Unite), Profesor Ivor J. Mason (MRC Centre for Developmentai Neurobiology, King's College, Marea Britanie).

Profesor Nicole Le Douarin (Institutul de Ştiinţe al Academiei Franceze, Collège de France, Franţa).

Profesor Sarah L. Pallas (Georgia State University, Statele Unite), Profesor Luis Puelles (School of Medicine, University of Murcia, Spania). Contribuţia lor critică a făcut, cu siguranţă, cartea mai bună: Dialogul efectiv pe marginea unor probleme particulare cu chiar cei care sunt asimilaţi reperelor în domeniu ne-a ajutat mult, ne-a motivat şi este o onoare. Prin ei, am minimizat probabilitatea ca această carte să nu îşi atingă scopul şi am asigurat, într-un fel, cititorul român, că se găseşte în actualitatea ştiinţifică.

Mulţumim în special Profesorului Luis Puelles de la Universitatea din Murcia, Spania, unul din cei mai proeminenţi neuroanatomişti contemporani, pentru că a citit lucrarea noastră şi a acceptat să îi scrie prefaţa. Într-devăr, aceste comentarii şi multe altele, pe care nu le-am pus aici, ne-au onorat. Cititorul român a căpătat astfel tangenţa cu o personalitate ştiinţifică considerată de comunitatea specialiştilor în neuroştiinţe drept cel mai înalt scaun în neuroanatomia şi

neuroembriologia moleculară contemporană. Pe de altă parte, astfel, ne simţim mai aproape de conaţionalul nostru genial, Profesorul

G. Marinescu care, în 1909, primea o prefaţă pentru cartea sa, *La Celule Nerveuse,* din partea ascendentului lui Luis Puelles, S. Ramón y Cajal.

Textul este ilustrat cu numeroase figuri şi poze, unele dintre ele concepute de noi. altele oferite de numeroşi cercetători, din toată lumea. Le mulţumim că ne-au ajutat să selectăm imaginile cele mai reprezentative din cercetările lor şi că ne-au permis să le folosim aici.

Acest volum ca, de altfel, tot ceea ce facem bine este un efect al istoriei noastre personale şi profesionale. Tuturor celor cărora nu vom reuşi să le mulţumim, îi rugăm să zâmbească şi să fie siguri că memoria noastră le acordă o mulţumire tacită.

Desăvârşirea noastră profesională se leagă de activitatea didactică şi experimentală pe care o desfăşurăm la Catedra de Psihologie de la Facultatea de Psihologie şi Ştiinţele Educaţiei, Universitatea „Babeş-Boayai" şi Catedra de Fiziologie de la Facultatea de Medicină, Universitatea de Medicină şi Farmacie „Iuliu Haţieganu", din Cluj-Napoca. Mulţumim colegilor care susţin excelenţa acestor catedre.

La apariţia acestei cărţi au contribuit direct multe persoane. Mulţumim în primul rând domnişoarei psiholog Monica Giurgiu, pentru prietenia şi solicitudinea cu care ne-a înconjurat. Fără acestea, e posibil! ca această carte să fi cunoscut altfel sau altcândva tiparul. Mulţumim Editurii Dacia, a cărei tradiţie şi excelenţă sunt menţinute în primul rând de dăruirea domnului Ion Vădan. Nu în ultimul rând mulţumim domnilor informaticieni Sorin Olteanu şi Adi Vlaic care au salvat de prea multe ori manuscrisul de la o dispariţie prematură în faţa virusilor găzduiţi generos de calculatorul nostru.

Un gând special se îndreaptă către mentorii şi prietenii noştri, din păcate prea mulţi pentru a fi menţionaţi aici. Le promitem că o să continuăm lista la următorul volum! Două prezenţe exemplare, pe care ţinem să le invocăm prin mulţumirile noastre sunt domnii Profesor Mircea Miclea şi Lector dr. Adrian Opere (Catedra de Psihologie, Universitatea „Babeş-Bolyai"). Într-adevăr, spiritul lor este aici prin modelul pe care ni-l oferă. A.C.M. doreşte să recunoască contribuţia, poate una din cele mai importante pentru preocupările ştiinţifice actuale, a doamnei Profesor Maria Nicolae (Colegiul Naţional „Ion C. Brătianu", Piteşti). Acelaşi autor doreşte să recunoască aici contribuţia domnului Lector dr. Procopie P. Ciontea (Universitatea din Piteşti), şi el prezent prin spiritul academic şi personal pe care ni-l inspiră. Cea

mai sinceră recunoştinţă şi admiraţie le îndreptăm către doamnele Emilia Pârvu şi Agneta Predescu, din a căror noblețe încă mai avem de învăţat (A.C.M.). Viitorul didactic şi de cercetare este datorat în întregime mentorului, profesorului şi colegului nostru Profesor Adrian I. Olteanu, de la care am învăţat entuziasmul şi dăruirea pentru Academie (A.C.M.) –

Mulţumim sincer studenţilor noştri pentru răbdarea şi entuziasmul cu care ne fac să simţim că participăm la formarea lor ştiinţifică. Invităm cititorii să nu lase materializarea intenţiei noastre să tacă: după ce vor fi citit cartea, dacă a fost utilă.

XI

lua în considerare sfatul domniilor voastre noastre sei Xpi

Octombrie 2002

XII

LISTA DE ABREVIERI

2-DG *(2-deoxyglucose)*, *2* deoxiglucoză

6-OHDA, 6-hidroxidopamină

ADN, acid dezoxiribonucleic

AMPC, adenozin monofosfat ciclic

AMPA *ţalfa-amino-3-hydroxy-5 methyl-4 isoxazolepropionic acid)*, acid a-amino-3-hidroxi-5-metil-4 Isoxazolpropionic

ANR *(anterior neural ridge)*, creasta neurală anterioară

Apar *ţapoptotic protease-activating factor)*, factor activator al proteazei apoptotice

Apoer *(apoliprotein receptor)*, receptor al apoliproteinei

AR, acid retinoic

ARNM, acid ribonucleic mesager

ATP, acid adenozin trifosforic

AVE *ţanterior visceral endoderm)*, endoderm visceral anterior

BDNF *(brainderived neurotrophic factor)*, factor de creştere derivat cerebral

BMP *(bone morphogenetic protein)*, proteină morfogenetică osoasă

BOLD *(blood-oxygenation-leveldependence)*, [semnal] dependent de nivelul sangvin de oxigen bp *(base pair)*, *bază* pereche

CAM *(cell adhesion molecule)*, moleculă de adeziune celulară
Cdk *(cyclin-dependent kinasis)*, kinază ciclin-dependentă
Ced *(cell death protein)*, proteine asociate morţii celulare
Cg, cistatina C
CGE, celule germinative embrionare
CNTF *(ciliary neurotrophic factor)*, factor neurotrofic ci Har
CO, monoxid de carbon
CREB (CAMP response binding element), element de cuplare AMP – cdependent
CSE, celule suşe embrionare
CT (computer tomography), tomografie computerizată
Da, daltoni
E, zi embrionară
EEG, electroencefalogramă
EGF *(epidermal growth factor)*, factor de creştere epidermal
Eph *(ephrine)*, efrină
FGF *(fibroblastic growth factor)*, factor de creştere fibroblastic
GABA *(gamma-aminobutyric acid)*
acid gama-aminobutiric
GAD *(glutamate decarboxylase)*, glutamat decarboxilază
GFAP *(glia! fibrillary acidic protein)*, proteina glială fibrilară acidă
GGF *(glial growth factor)*, factor de creştere glial
GRUP, guanozin monofosfat ciclic
GTP *(guanozin triphosphate)*, guanozin trifosfat
HBS *(homeobox binding sites)*, secvenţe de cuplare pentru molecule
PAX
HH *(hedgehog)*, moleculă din familia
HO, hemoxigenază
Hox (homeobox), gene cu homeocasetă
Hz, herţi
LAMP *(lymbic sistem-associated membrane protein)*, proteina membranară asociată sistemului limbic
LIF *(leukemia inhibitory factor)*, factor leucemie inhibitor
XIII
LTP *(long-term potentiation)*, potenţare de lungă durată.
MAP *(microtubule-associated protein)*, proteină asociată

microtubulilor

MBP *(myelin basic protein)*, proteina de bază a mielinei

MTI *(magnetization transfer imaging)*, imagistică cu transfer de magnetizare

N-CAM *(neural cell adhesion molecule)*, molecula neuronală de adeziune celulară

NGF *(nerve growth factor)*, factor de creştere neuronal

NMDA *(N-methyl-D-aspartate)*, Nmetil-I) – aspartat

NO, monoxid de azot

NOS, NO sintaza

NRSE *(neural restrictive silencer element)*, element represor neural restrictiv

NT *(neurotrophine)*, neurotrofină

O-A2 *(oligodendrocyte type II astrocyte)*, oligodendrocit-astrocit de tip 2.

ORE *(origin replication complex)*, complex de replicare de la origine p, prozomer

P, zi postnatală

PO, proteina O

Pax (paired box), gene cu casetă pereche

PBS *(paired box binding sites).* secvenţe de cuplare pentru molecule

PAX

PDGF *(plateletderived growth factor)*, factor de creştere derivat din plăcuţe

PET, pozitron emission tomography

PK, protein kinază

PS *(polysialated)*, polisiaiat **v** r, rombomer

RMNF *(FMRI, funcţional magnetic resonance imaging)*, tomografia de rezonanţă magnetică funcţională

RMS *(rostral migratory stream).* reţea migratorie rostrală

SIDS *(sudden infant death syndrome)*, sindromul morţii infantile spontane

SNC, sistem nervos central

SNP, sistem nervos periferic

SPECT *(single photon emission tomography)*, tomografia cu

emisie a unui foton singular

SSEA *(stage-specific embryonic antigen)*, antigeni celulari specifici unei etape de dezvoltare embrionară

TGF-/? *(transforming growth factor*

?), factor de creştere transformator/?

TMS *(temporal migratory stream)*, reţeaua migratorie temporală iuj

VIdl, *very low density Hpoprotein*

WNT *(wingless)*, molecule din familia

XIV

Capitolul 1

NEUROŞTIINŢE. ISTORIA CONCEPŢIILOR ŞI A PROGRAMELOR DE CERCETARE DESPRE CREIER

CONŢINUTUL CAPITOLULUI:

Progresul timpuriu al neuroştiinţelor a fost guvernat de metode Teoria neuronului şi cei trei mari: Ramón y Cajal, Golgi şi Marinescu Formarea neuroşfiinţelor şi primele programe de cercetare Neuroştiinţele cognitive şi neuroimagistica funcţională

Genomică, neuroembriologia moleculară şi neurobiologia evoluţionistă: Triada imperială \ Rezumat

„Nu există studiu ştiinţific mai vital pentru om decât studiul propriului său creier, întreaga noastră concepţie despre univers depinde de acesta". (F. H.C. Crick, 1980, pp. 188)

În această carte, vom explica metode prin care poate fi studiat creierul, vom expune o parte din datele experimentale care susţin tezele „tari" ale neuroştiinţelor contemporane şi care fac din acest domeniu una dintre ştiinţele experimentale cele mai avansate. Altfel spus, vom încerca să înţelegem structura şi funcţia sistemului nervos în contextul dezvoltării şi plasticităţii sale. Ceea ce vom aborda însă în acest prim capitol va fi modu'! în care a evoluat concepţia despre creier. Vom avea inspiraţia, poate, de a surprinde în acest spaţiu propria noastră concepţie despre creier.

Am ales afirmaţia lui F.H.C. Crick pentru începutul acestui capitol din mai multe motive. În primul rând pentru că nu ne propunem să facem o simplă enunţare a descoperirilor care au marcat acest domeniu. Dacă ne-am limita la atât, am salva eforturile cititorului şi l-am trimite la referinţe reprezentative. Ceea ce încercăm este să oferim o istorie a concepţiilor moderne despre creier. E ca şi cum, în

loc să surprindem concepţia de la apogeul carierei unuia din cercetătorii care au luat premiul Nobel pentru Fiziologie şi Medicină pentru descoperiri privind sistemul nervos, am vrea să înţelegem de ce el sau ea, ca şi noi, ca şi cei dintre domniile voastre care au abordat sau vor aborda o carieră în neuroştiinţe, a dorit să înţeleagă creierul. Şi e puţin probabil ca un asemenea cercetător să fi ajuns doar prin forţa circumstanţelor să activeze în neuroştiinţe. Acest domeniu înseamnă actualmente un corp enorm de date experimentale care impune novicelui un efort teoretic semnificativ şi o pregătire experimentală de lungă durată.

Revenind la intenţia noastră şi la afirmaţia lui Crick, o teză tare a neuroştiinţelor este că creierul este organul responsabil pentru ceea ce numim minte. În termeni moderni, creierul elaborează cogniţia şi coordonează comportamentul. Nu ar fi înţelept să credem astăzi că acestea sunt emanaţii supraumane. Ceea ce spune Crick este că toată ştiinţa, de la fizică, la fiziologie şi

1

psihologie au articulat eforturile omului de a se înţelege ca individ şi ca specie Trebuie să înţelegem ce determină şi susţine comportamentul nostru, de *q* comunicăm prin sisteme de semne şi nu doar chimic, de ce suntem diferiţi, în fine de ce suntem curioşi într-un chip natural să căpătăm răspuns la toate acestf întrebări. Am inventat metode şi instrumente de a urmări evoluţia materiei din afara planetei noastre, de multe ori, chiar la distanţe de ani lumină. Mai mul călătorim în spaţiu, căutând alte specii. Dar dacă ne vom întâlni cândva cu o asemenea specie? Ca să putem comunica, trebuie să înţelegem în primul rând diferenţele dintre noi şi respectiva specie. Undeva în explicarea caracteristiciloi indivizilor din specia noastră trebuie să pomenim creierul, ca sistem specializat pentru a susţine cogniţia şi a coordona comportamentul.

Un alt motiv pentru care l-am ales pe Crick ca să premeargă propriile noastre cuvinte ţine de cariera acestui cercetător. împreună cu J.D. Watson, acesta a elucidat structura stereochimică a moleculei de ADN, aceştia doi împărţind cu M, Wilkins premiul Nobel pentru Fiziologie şi Medicină în 1962 (vezi: Crick, 1962; dar şi: Watson & Crick, 1953). Concepţia de cercetare a lui Crick a fost că există lucruri despre care nu se ştie prea mult, dar care par explicabile cu metodele ştiinţifice existente şi lucruri care nu par explicabile cu mijloacele de

care dispui la un anumit moment. Această concepţie, esenţială, l-a condus pe Crick şi pe alţii la a schimba la un moment dat dintr-o carieră de vârf profilul problemelor pe care le abordează. Acest cercetător a considerat de la început că structura ADN-ul, i, care nu părea a putea fi explicată uşor din spectrele de difracţie ale moleculei, ca şi natura electrică şi chimică a neuronilor, celulele care stau la baza funcţiei sistemului nervos, sunt probleme care intră în prima categorie, şi anume, explicabile. Textul lui Crick, din care am preluat citatul, este din perioada în care acesta şi-a manifestat explicit interesul profesional pentru neurobiologie. După cum ne putem da seama, carierele pionierilor din ştiinţe sunt ghidate de problemă, nu de licenţa pe care o posedă sau de graniţele unui domeniu ştiinţific. În cazul lui Crick, avem o dovadă declarată că activitatea sa, începând din anii ’80, a pornit de la curiozitatea sa de a înţelege creierul: într-adevăr, un motiv exemplar.

Creierul nu este un mister, este un ţesut. Neuronii sunt celulele care susţin funcţia fundamentală, de semnalizare, a acestui ţesut. Dacă acceptăm că funcţia de semnalizare a sistemului nervos este un sistem de semnale, să zicem electrice, în care este elaborată cogniţia şi prin care sunt coordonate mecanismele senzitivo-senzoriale şi motorii care susţin comportamentul, atunci trebuie să acceptăm că sistemul nervos evoluează. De ce? Din raţiuni logice: avem două premise care susţin că creierul coordonează efecte cognitiv-comportamentale şi ştim că acestea din urmă nu sunt stereotipe, se adaptează sub presiunea mediului, deci, şi creierul evoluează. Cu alte cuvinte, efectele pe care le generează acest mecanism numit creier sunt cogniţia şi comportamentul. Comportamentul este plastic, deci, şi creierul trebuie să fie plastic. Neuronatomiştii pipăie organul care susţine adaptarea speciei noastre. Ei investighează structura unui creier pe care neurofiziologii şi neuropsihologii îl descriu funcţional. Acestea sunt principiile cu care am scris această carte. În continuare, le vom aborda punctual şi, odată cu acestea, vom trece în revistă progresele câieie ale neuroştiinţelor moderne. În general, vom evita prezentarea unor concepţii precursor şi vom trata mai ales începuturile neuroştiinţelor ca domeniu experimental (pentru o prezentare complementară, vezi: Voiculescu & Steriade, 1963, pp. 11 – 30).

1.1 Progresul timpuriu al neuroştiinţelor a fost guvernat de metode

În afară de inventarea microscopului în secolul XVII de către A. von Leewenhoek, descoperirile fundamentale care pot fi asociate cu începutul erei moderne a neuroştiinţelor sunt confirmarea teoriei neuronului de către S. Ramón y Cajal şi conceptul de transmitere sinaptică, argumentat de C. Sherrington şi probat experimental de H. Dale, O. Loewi, W. Feldberg, S. Kuffler şi B. Katz în cazul sinapselor periferice şi, mai apoi, de către J. Eccles şi colaboratorii pentru sinapsele centrale. Acestea sunt reperele de la care vom începe prezentarea noastră. Avertizăm, însă, de la început, cititorul că orice istorie este influenţată de disciplina şi interesul celor care o scriu, chiar acest text lăsând deoparte numeroase progrese semnificative pentru evoluţia neuroştiinţelor.

După invenţia sa, microscopul a trebuit să aştepte aproape două secole pentru a fi utilizat cu încredere ca instrument ştiinţific de către anatomişti. Cel mai simplu microscop dispunea de o singură lentilă şi putea mări de aproximativ 200 – 300 de ori numai obiecte foarte mici, de mărimea unui vârf de ac. Dar microscopul, ca instrument de cercetare, avea nevoie şi de materiale şi tehnici auxiliare. Astfel, lentilele acromatice au fost inventate numai în 1826, iar tehnicile de preparare a secţiunilor au devenit accesibile numai spre sfârşitul secolului XIX. R. Hooke este cel care a construit prototipul microscoapelor optice din zilele noastre, acesta putând mări însă numai de 20 – 30 de ori. Oricât ne-ar părea de paradoxal *astăzi,* anatomiştii au fost la început reticenţi la folosirea microscopului, mulţi pretinzând că observaţiile făcute cu ajutorul acestui instrument nu sunt credibile. Pentru neuroanatomişti, presiunea a fost însă mare pentru că observarea macroscopică a creierului, fără a fi asistată de investigarea microscopică a unor preparate histologice, s-a dovedit a nu fi foarte informativă (pentru detalii, vezi: Bracegirdle, 1986; dar şi: Bullock, Northcutt & Bodznick, 1982). Ca dovadă, cu excepţia identificării de către J. Purkinje a neuronilor care îi poartă astăzi numele, studiile de anatomie publicate înainte de 1800 s-au limitat la descrierea anatomiei externe şi a anatomiei interne de ansamblu.

Descrierea fină a ţesutului nervos a început odată cu introducerea de către medicul italian C. Golgi a unei metode de impregnare (etichetare) selectivă a neuronilor. Golgi descoperă metoda în 1873, în timp ce încerca să pună în evidenţă meningele, cu instrumente improvizate, într-un laborator rudimentar de la ospiciul

din Abiattegrasso unde lucra ca medic, înainte de a fi chemat ca profesor la Universitatea din Pavia (Fig. 1.1). Golgi observase că ţesutul nervos ţinut în prealabil în bicromat de potasiu şi impregant apoi cu nitrat de argint susţine ceea ce el a numit *la reazione nera,* adică reacţia neagră care conturează celula nervoasă.

Metoda lui Golgi aducea un progres semnificativ în studierea ţesutului nervos, pentru că, cu ajutorul acestei metode sunt puse în evidenţă o mică parte din neuronii dintr-o reţea, fiind vizibile şi procesele acestora. Înainte de metoda Golgi, J. von Gerlach propusese în 1858 colorarea cu carmin, prin care componentele ţesutului nervos puteau fi conturate vag prin diferenţele de intensitate ale coloraţiei. S. Ramón y Cajal este ce! care a îmbunătăţit şi a aplicat metoda Golgi mai întâi în studiul cerebelului şi al măduvei spinării şi apoi la nivelul cortexului cerebral, bulbului olfactiv, retinei şi a altor structuri din sistemul nervos al embrionilor şi al animalelor tinere. Cu ajutorul metodei Golgi, S. Ramón y Cajal, G. Marinescu şi alţii aduc argumente în favoarea „doctrinei neuronului", după care sistemul nervos este compus din unităţi morfologice şi funcţionale autonome numite neuroni (vezi: Ramón y Cajal, 1906; Marinescu, 1895).

Fig. 1.1 *Reprezentanţi de seamă ai anatomiei, din generaţia lui C. Golgi. De la stânga la dreapta, şezând: Perroncito, Kdiliker, Fusari; de la stânga la dreapta, în picioare: Bizzozero, Golgi.*

Coloraţia Weigert, descrisă în 1 882 de cercetătorul care i-a dat numele, permite evidenţierea tecii de mielină din jurul unora dintre fibrele nervoase prin colorarea acestora în negru albăstrui. Astfel au putut fi urmărite unele proiecţii mai izolate din sistemul nervos central, metoda făcând însă dificilă urmărirea unui fascicul, mai ales când acesta nu este foarte compact. Acest neajuns a fost depăşit odată cu descrierea unei metode prin care se produce iezarea experimentală a unui centru nervos, fiind observată apoi degenerarea specifică a proiecţiilor care leagă centrul lezat de alte structuri. Fiziologul A.V. Waller descrisese de la 1850 transformările care sunt asociate secţionării unei rădăcini nervoase, printre acestea fiind umflarea şi îngroşarea axonilor care sunt separaţi prin secţiune de centrul metabolic reprezentat de corpul celular, precum şi fragmentarea tecii de mielină. Acest tip de degenerare se numeşte walleriană sau anterogradă. V. Marchi este cel care a descoperit că resturile de mielină pot fi colorate cu acid osmic, astfel că traiectul unui fascicul

nervos poate fi reconstituit după resturile de mielină care ajung să semene cu nişte urme adânci pe un covor de zăpadă (Voiculescu & Sfen ade, 1963). Metoda lui Marchi nu colorează însă exclusiv traiectele degenerate, ci, uneori, şi ţesutul nervos integru. W.J.H. Nauta introduce în anii ’50 o metodă de colorare argentică a tracturilor nervoase degenerate, putând fi puse în evidenţă astfel şi fibrele nemielinizate, cu tot cu terminaţiile sinaptice ale acestora (Nauta & Gygax, 1954). Structura fină a corpului celular a putut fi vizualizată prin metoda descrisă de F. Nisst, care, prin impregnarea cu culori bazice de anilină, cum ar fi albastrul de metilen, a evidenţiat granule răspândite în citoplasmă neuronului care ştim astăzi că sunt organite specifice corpului neuronal, formate din agregate de ribozomi şi numite şi corpi tigroizi (pentru detalii, vezi: Olteanu & Lupu, 2000, pp. 27 – 31).

Metodele moderne de etichetare permit determinarea precisă a traseului axonilor. Metodele de etichetare anterogradă se bazează pe faptul că neuronii absorb aminoacizi care sunt conduşi prin transportul axoplasmatic anterograd rapid până la nivelul arborizaţiei terminale. Aminoacizii sunt marcaţi radioactiv, de obicei, cu tritiu, izotopul radiactiv al hidrogenului. La câteva zile după injectarea markerului, se prelevează secţiuni de la diferite niveluri ale tractului al cărui traseu vrem să îl determinăm, iar acestea sunt plasate în contact cu o emulsie fotografică şi menţinute la întuneric timp de câteva săptămâni. În acest timp, particulele radioactive reacţionează cu emulsia fotografică care este apoi developată şi pe care se pot observa axonii celulelor ai căror corpi celulari se află în apropierea locului în care a fost injectat markerul. Metodele retrograde dau posibilitatea evidenţierii corpului celular şi se bazează pe injectarea unui agent care este preluat de buton îi terminali şi transportat retrograd cu o viteză de 200 – 300 mm/zi spre corpul Celular al neuronului. Un astfel de agent este o enzimă izolată şi purificată în anii ’70 din planta de hrean şi numită peroxidaza de hrean. La câteva zile după injectarea peroxidazei de hrean, creierul este secţionat şi secţiunile sunt colorate cu un martor care reacţionează cu peroxidaza. Corpurile celulare marcate sunt ale axonilor din apropierea locului în care a fost făcută injecţia şi care au preluat peroxidaza de hrean (pentru detalii tehnice, vezi: Kapp, Schwaker & Driscoll, 1985).

Odată cu demonstrarea existenţei neuronilor de către Ramón y

Cajal şi Marinescu, cercetările au fost îndreptate către studierea formaţiunilor de contact prin care neuronii comunică. C. Sherrington denumeşte sinapse aceste conexiuni funcţionale care se realizează prin apoziţia celulelor (Sherrington, 1897). Contribuţia majoră lui Sherrington este că a arătat cum reacţiile sistemului nervos pot fi explicate prin integrarea comportamentului neuronilor individuali, fiecare funcţionând ca o unitate şi exercitând acţiuni sinaptice excitatorii sau inhibitorii graduale asupra altor neuroni. Dacă în integrarea acestor influenţe sinaptice predomină inhibiţia, răspunsul funcţional al unei celule este inhibiţia, definită ca un antagonist cantitativ al excitaţiei. Dacă predomină influenţele sinaptice excitatorii. celula generează un impuls după legea „tot sau nimic" care se propagă de-a lungul axonului şi exercită, la rândul lui, influenţe sinaptice de acelaşi sens. Simplu formulat, principiul demonstrat de cercetările lui Sherrington este că, la un moment dat, comportamentul celulei este determinat de una din cele două stări funcţionale posibile (rezultante ale integrării influenţelor sinaptice pe care le suportă celula): activarea de către un impuls sau latenţă (vezi: Sherrington, 1897, 1906; dar şi: Sherrington, 1929, 1931).

În anii '30, O. Loewi, H. Dale şi W. Feldberg stabilesc în cazul sinapselor neuromuscuâare şi al sinapselor din sistemul nervos periferic că semnalul prin care neuronii comunică constă dintr-o substanţă numită neurotransmiţător care difuzează de la nivel presinaptic spre membrana celulei postsinaptice (vezi: Dale, 1936; Loewi, 1936). Deşi Loewi respinge iniţial posibilitatea acestui tip de comunicare la nivelul sinapselor centrale, J. Eccles şi colaboratorii confirmă acelaşi mecanism cuantic de comunicare sinaptică în sistemul nervos central (vezi: Eccles, Eccles & Fatt, 1956; Eccles, Fatt & Koketsu, 1954).

La începutul secolului trecut, se ştia că neuronii au un potenţial electric numit potenţial de repaus şi că semnalizarea de-a lungul axonului se realizează printr-un semnal electric care se propagă, numit potenţial de acţiune, care se credea că anulează potenţialul de repaus. În 1937, A. Hodgkin descoperă că potenţialele de acţiune dau naştere la un curent local care depolarizează regiunea adiacentă a membranei axonale suficient pentru a declanşa un val de depolarizare care se propagă. În anii '40, A. Hodgkin, A. Huxley şi B. Katz confirmă ipoteza ionică arătând că potenţialul de acţiune inversează potenţialul de

repaus şi se bazează pe mişcarea unor ioni de potasiu, sodiu şi clor, prin canale ionice din membrana axonului (vezi: Hodgkin, 1951). Aceste studii au beneficiat de perfecţionarea de către biofizicianul K.S. Cole a unei tehnici de înregistrare numită voltaj-clamă *(vollage clamp).* Metoda constă dintr-un circuit care permite menţinerea potenţialului de membrană constant, fără de care regiuni diferite ale membranei axonului (axolemă) au potenţiale de membrană diferite. Acest circuit include doi electrozi laterali care restrâng curentul măsurat la o singură regiune de axolemă; în mijlocul intervalului dintre aceştia se află un electrod de argint prin care se introduce un curent pentru a menţine potenţialul de membrană constant. Curentul aplicat prin electrod este măsurat ca o scădere de voltaj şi este egal şi opus faţă de curentul ionic generat de un axon în timpul unui impuls (pentru detalii, vezi: Cole. 1949).

B. Katz şi R. Miledi indică faptul că şi transmiterea sinaptică depinde de canale ionice, doar că acestea sunt în cea mai mare parte controlate chimic de un ligând reprezentat de un neurotransmiţător ca acetilcolina (vezi: Katz & Miledi, 1972). Aceste cercetări oferă perspectiva înţelegerii funcţionării sistemului nervos în termeni fizico-chimici care reprezintă un adevărat limbaj universal al biologiei celulare. Până în anii ’70, numeroşi aminoacizi, peptide şi alte molecule mici se relevă că au rol de neurotransmiţător pentru ca, astăzi, să se cunoască mai mult de 100 de molecule cu această funcţie. În aceeaşi perioadă, E.J. Furshpan şi D.D. Potter arată că există şi sinapse electrice (vezi: Pappas & Purpura, 1972, pp. 221).

Studiul canalelor ionice care intermediază transmiterea sinaptică s-a dezvoltat odată cu descrierea tehnicii clemei de petic (*patch-clamp),* denumită sugestiv pentru avantajul pe care îl oferă de a măsura curentul care trece printr-un singur canal ionic. Introducerea acestei tehnici propusă de E. Neher şi B. Sakmann

a constat din fabricarea unui electrod numit electrod de petic (*patch electrode)* pentru că are un vârf neted cu o deschizătură cu diametru de doar 1 um. Electrodul este plasat astfel încât să preseze suprafaţa unei celule, izolând astfel un „petic” de membrană aflat imediat sub vârful deschis al electrodului. Activitatea unui canal este detectată ca o schimbare unică în curentul de membrană (pentru detalii, vezi: Conţi & Neher, 1980). Această metodă permite analiza

canalelor la un nivel molecular şi analiza schimbărilor funcţionale şi conformaţionale ale unei singure proteine membranare.

Acestea sunt o parte din descoperirile care au marcat începutul neuroştiinţelor. Ele ilustrează foarte bine faptul că inventarea sau perfecţionarea unor metode este schimbarea cheie care soluţionează trecerea de la teorie la fapt experimental. Astfel, realităţi pe care astăzi nu le mai punem la îndoială, cum ar fi neuronul şi sinapsa, ba, uneori, le considerăm aprioric adevărate, au fost cândva doar teorii. Pentru un începător, este fundamentală cunoaşterea dezbaterilor teoretice şi a metodei. De pildă, de-abia la începutul secolului trecut, doctrina neuronului a început să fie acceptată, controversa din jurul acestei teorii impunând cel puţin trei mari figuri care sunt asimilate începutului neuroştiinţelor.

1.2 Teoria neuronului şi cei trei mari: Ramón y Cajal, Golgi şi Marinescu

Senzaţia pe care o ai după ce citeşti o anumită cantitate de lucrări din perioada clasică a unei ştiinţe experimentale este că granulaţia de adevăr este acolo mai mare. Adică, dacă faci documentarea pentru o carte, de pildă, eşti obligat să aliniezi toate teoriile şi datele experimentale care au instrumentat elucidarea unei realităţi. În neuroştiinţe, cu cât avansezi spre datele mai recente, cu atât aglomerarea de rezultate experimentale creşte şi apare nevoia de a le îmbrăca teoretic. Altfel spus, la începutul neuroştiinţelor, ca, de altfel, în orice altă ştiinţă experimentală, apare o idee care. poate fi testată cu o metodă. După fiecare tranşă decisivă de probe experimentale care confirmă sau infirmă ideea, urmează integrarea respectivei descoperiri într-un punct de vedere general despre obiectul de studiu fundamental. De exemplu, după ce s-a verificat existenţa neuronului, Ramón y Cajal şi Marinescu au făcut un pas înapoi spre teorie şi au încercat să vadă cum anume schimbă descoperirea lor concepţia despre creier, în general. Ceea ce vrem să spunem este că, la începutul ştiinţelor, primele date experimentale capătă mai uşor valoare axiomatică, fiecare descoperire este ca un punct de sprijin testat pentru a mişca Pământul, în cazul nostru, creierul! în contrast, cu cât neuroştiinţele au avansat, demonstraţiile experimentale s-au redus la particule din ce în ce mai mici de realitate pe care le verifică într-o succesiune logică. Aproape nimeni, acum, nu se mai încumetă să integreze segmentul reprezentativ de date

experimentale pentru a aprecia cât ştim despre creier. Ştiinţa modernă e mai puţin luxoasă, ea îşi distilează în mod repetat substanţa experimentală.

Teoria neuronală delimitează poate perioada cea mai exaltată de la începutul neuroştiinţelor. La sfârşitul secolului XVIII, predomina concepţia lui J.

7

von Gerlach, propusă în 1872, care susţinea, pe baza observării preparatelor colorate cu carmin, că sistemul nervos este format din reţele difuze *(la rete nervosa diffusd).* Aceste reţele difuze se considera că sunt formate din prelungiri protoplasmatice şi că trimit fibre care conectează mai multe reţele, unele directe, de la nivelul legăturilor dintre nodurile reţelelor şi altele indirecte, de la nivel interstiţial. Erau puţini cei care puneau la îndoială existenţa acestor reţele difuze. Sigur, era nevoie de o metodă de colorare mai clară, astfel că, la apariţia în 1872 a metodei de colorare neagră argentică a lui Golgi, aceasta a avut un rol decisiv, deşi chiar Golgi considera că a găsit în propriile sale preparate demonstrarea existenţei unei reţele de filamente aflate în relaţii de continuitate. În 1891 însă W. von Waldeyer-Hartz introduce termenul de neuron şi susţine foarte clar că:

„Sistemul nervos este format din nenumărate unităţi nervoase(*neuroni)* care sunt independente anatomic şi genetic. Fiecare unitate nervoasă este compusă din trei părţi: corpul, fibra şi ramurile terminale.

Conducerea fiziologică poate avea loc la fel de bine de la corp spre ramurile terminale ca şi în alte direcţii.

Impulsurile motorii pot fi transmise de la corp spre ramurile terminale, în timp ce impulsurile senzitive pot merge în oricare dintre direcţii". (von Waldeyer-Hartz, *apuci.* Golgi, 1906, pp. 190)

Bazele teoriei neuronale au fost puse de anatomiştii W. His, cel care arătat că primordiul sistemului nervos provine din ectoderm, iar vasele sanguine cerebrale îşi au originea embrionară în mezoderm, şi A. Forel, care a avut cercetări mai ales privind structurile regiunii subtalamice. Cei doi au susţinut că fibrele nervoase sunt prelungiri ale celulelor nervoase care sunt în relaţie de contiguitate cu alte fibre şi că nu se anastomozează.

Cel care a aplicat sistematic metoda Golgi în aproape toate structurile sistemului nervos este însă S. Ramón y Cajal. Evenimentul

cheie în cariera lui Ramón y Cajal a fost descoperirea de către acesta a metodei Golgi ia preparate aduse de un prieten, psihiatru, care tocmai venise de la Paris. La vremea aceea, Ramón y Cajal, care avea 35 de ani, era interesat de sistemul nervos mai ales pentru a strânge imagini pentru o carte despre tehnici histologice. El realizase cât de inadecvate sunt metodele de colorare a ţesutului nervos când descoperă metoda Golgi despre care spune că o privire a fost suficientă pentru a vedea că „celulele nervoase apăreau colorate maroniu, chiar negre, cu cele mai fine rămurele, evidenţiindu-se cu o claritate de neîntrecut pe un fond galben transparent. Totul era clar ca un desen cu cerneală chinezească" (Ramón y Cajal, 1989). Descris de contemporani ca „un entuziast furios", Ramón y Cajal aplică metoda Golgi, pe care chiar o modifică, pe preparate de retină, cerebel şi măduva spinării, descriind acea perioadă ca pe una de mare efuziune: „[...] pe măsură ce noi fapte apăreau pe preparatele mele, ideile îmi fierbeau şi se înghesuiau în mintea mea. O febră de a

Sublinierea noastră.

publica mă devora". (Ramón y Cajal, 1989) Nu e greu de înţeles că dorinţa de a publica pornea de la claritatea cu care imaginile contraziceau teoria cea mas influentă despre structura sistemului nervos, cea a reţelei neuronale. Ramón y Cajal aruncă în aer teoria reticulară al cărei principal suporter era chiar Golgi, mergând la Berlin la Congresul Societăţii de Anatomie Germane, unde obţine recunoaşterea şi suportul unei autorităţi în histologie, R.A. von Kolliker. Ramón y Cajal publică între 1894 – 1904 un tratat monumental de histologie a sistemului nervos, în două volume, în care oferă nenumărate exemple de organizare a celulelor nervoase în sistemele nervoase central şi periferic de la diferite specii de animale. Ramón y Cajal devine, chiar şi numai prin acest tratat, titanul neuroanatomiei moderne (Fig. 1.2). Teoria reticulară intrase într-o agonie dureroasă.

Cei doi, S. Ramón *y Cajal şi C. Golgi primesc premiul* Nobef pentru Fiziologie şi Medicină în 1906. Golgi, care fusese propus pentru această distincţie

Fig. 1.2 *Memento de cercetător. S. Ramón y Cajal stând la microscop. Poză din 1920.*

trei ani (1901, 1905 şi, apoi, în 1906 cu Ramón y Cajal), ţine o prelegere celebră „Doctrina neuronului – Teorie şi fapte" în care

reafirmă că aceasta vine într-o perioadă în care „această doctrină este recunoscut că nu mai este favorizată” 2 (Golgi, 1906, pp. 189). Golgi reitera concepţia după care dendritele, aşa cum numim astăzi procesele multiple din partea proximală a neuronului, sunt strict elemente nutritive pentru neuroni şi nu sunt implicate în conducerea impulsurilor nervoase. Prelegerea ţinută după aceea, într-un stil furtunos, de Ramón y Cajal contrazice în totalitate afirmaţiile lui Golgi (vezi: Ramón y Cajal, 1906).

Morfologi ca Apathy, Bethe, care lucra pe crustacee şi Held publicaseră între! 892 şi 1897 lucrări în care credeau că se reconfirma existenţa unei reţele nervoase difuze şi că, mai mult, corpul celular al neuronului nu joacă niciun rol în realizarea reflexelor nervoase. În acea perioadă, chiar şi Nisst începuse să cocheteze cu teoria reticulară apărată de Golgi.

Contribuţiile celor doi, în pofida convingerilor ştiinţifice ale lui Golgi, sunt la fel de importante. Golgi este cel fără metoda căruia Ramón y Cajal nu ar fi putut, probabil, da argumente decisive pentru teoria neuronului.

Contribuţiile lui Ramón y Cajal la dezvoltarea neuroştiinţelor sunt foarte numeroase şi diverse. El formulează aşa-numita lege a polarizării dinamice, considerând că celulele nervoase sunt polarizate, adică primesc informaţii în zona corpului celular şi dendritelor şi conduc informaţia spre locaţii distale, prin axoni (Ramón y Cajal, 1991). Principiul s-a verificat experimental. El observă chiar foarte detaliat existenţa sinapselor, descrise ca *pies* (picioruşe), *botones* (butoni), *anillos* (inele) sau *varicosidades* (varicozităţi). Lorente de No, unul din elevii săi, îi continuă observaţiile asupra sinapselor (Lorente de No, 1938). Mai mult, Ramón y Caja! este cel care descrie pentru prima dată existenţa spinilor dendritici, microstructuri de pe dendrite, specializate pentru facilitarea sinapselor, pe preparate colorate cu albastru de metilen. Tot el şi Lorente de No, R. oferă primele descrieri ale citoarhitecturii formaţiunii hipocampice (Ramón y Caja], 1892, 1900 a, b; vezi şi: Lorente de No, 1934). El mai descrie pentru prima dată stratul plexiform I al izocortexului, populat cu celule ale căror dendrite se întind pe suprafeţe foarte mari şi care vor fi numite de G. Retzius „celulele orizontale ale lui Cajal” şi, în zilele noastre, celule Cajal-Retzius (Ramón y Cajal, 1890). Până în 1901, Cajal a fost interesat de structura cortexului cerebral, descriind citoarhitectura

cortexurilor vizual, motor, auditiv, insular şi olfactiv la om (Ramón y Cajal, 1899 a, b, 1900 a, b). Pe lângă ascuţimea observaţiei şi clarviziunea interpretării, Ramón y Cajal a avut o scriitură remarcabilă, iar desenele după preparatele sale sunt reproduse şi astăzi în manualele de neuroştiinţe.

Unul din cei care au adus argumente irefutabile în favoarea teoriei neuronului a fost G. Marinescu. Preocupările profesorului român, pe vremea când era preparatorul lui V. Babeş la Catedra de Anatomie Patologică şi Bacteriologic la Universitatea din Bucureşti, au fost favorizate de experienţa cu coloraţia Nisst, pe care a căpătat-o ca bursier la Clinica din Salpêtrière, unde pregătea materialul microscopic pentru J.M. Charcot. El afirmă foarte devreme că elementele cromatofile, cum numea corpusculii Nisst, sunt structuri prezente în citoplasmă neuronului şi nu simple artefacte date de reacţia dintre celulă şi lichidul fixator, cum susţineau unii cercetători. În prelegerea de la decernarea Premiului Nobel, Ramón y Cajal apreciază că metoda Golgi a dat rezultate sclipitoare în mâinile lui Marinescu. Marinescu aplică metoda Golgi imediat ce aceasta apare. Studiile de degenerare ale acestuia au condus la concluzia că: „[...] sistemul nervos este compus din unităţi anatomice independente; dar, din punct de vedere funcţional, aceste elemente sunt strâns asociate, iar unda nervoasă se propagă, din aproape în aproape, de la un neuron la altul". (Marinescu, 1895; vezi şi: Marinescu, 1930) în 1909, Marinescu publică la Paris o monografie celebră numită „Celula nervoasă", prefaţată de S. Ramón y Cajal, care este citată şi astăzi ca referinţă fundamentală pentru începuturile neuroanatomiei şi neurohistologiei (Marinescu, 1909). În această lucrare, Marinescu aduce argumente experimentale din propriile cercetări nu numai pentru existenţa neuronului, dar şi pentru rolul corpusculilor Nisst ca

substrat al energiei potenţiale a celulei nervoase. La acea vreme, chiar şi Ramón y Cajal considera că aceşti corpusculi au doar un rol trofic. G. Marinescu a fost un cercetător cu un rol important în cea mai importantă controversă din ştiinţa acelor vremuri, teoria neuronului. Articolele sale, publicate peste tot în lume, au fost larg recunoscute şi pe bună dreptate, fără a suna a frustrare naţionalistă, G. Marinescu merita Premiul Nobe! odată cu Golgi şi Ramón y Cajal. Dincolo de aceasta, Marinescu a fost un adevărat Profesor, având o activitate de

cercetare intensă până spre sfârşitul vieţii, lucrând cu toate metodele de cercetare care deveneau disponibile în epocă şi iniţiind şi susţinând o generaţie de cercetători, la rândul lor, de renume mondial, dacă este să ne gândim fie şi numai la A. Kreindler şi O. Sager.

1.3 Formarea neuroştiinţelor şi primele programe de cercetare

Neuroştiinţele sunt astăzi unul din cele mai importante şi printre cele mai bine finanţate domenii ştiinţifice. Sub această denumire, sunt grupaţi specialişti care îşi revendică apartenenţa profesională la comunitatea neuroştiinţelor3. Sintagma' românească de specialist în neuroştiinţe viciază oarecum eticheta profesională(*neuroscientist)* pentru că poate da impresia că face trimitere la expertiza într-un domeniu tradiţional. Ori neuroştiinţele reunesc programe de cercetare pe probleme care sunt investigate cu cele mai diverse metode, specifice unor domenii ca neurofiziologia, neuroanatomia, neurofarmacologia, neurochimia şi psihologia cognitiv-comportamentală. Licenţa în unul din aceste domenii nu mai constituie o barieră pentru activarea într-un laborator de neuroştiinţe sau pentru obţinerea dreptului de a preda un curs universitar de neuroştiinţe (vezi şi: Delbrück, 1969). Cel puţin, aceasta este realitatea în ţările unde valorile de cercetare sunt reprezentate de problema şi metoda de cercetare.

Neuroştiinţele nu mai sunt demult monopolul ştiinţelor medicale întrucât, la ora actuală, majoritatea şefilor de laboratoare de neuroştiinţe au licenţă şi specializări în domenii nonmedicale. În ultima sinteză de istorie a neuroştiinţelor. trei somităţi de la Institutul Medical Howard Hughes din Statele Unite accentuează că: „Succesul continuu al neuroştiinţei şi entuziasmul său actual derivă în mare parte din încorporarea într-o singur cadru intelectual a unor discipline care înainte au fost independente. [...] Nimeni nu a anticipat ceea ce avea să devină trăsătura distinctivă a neuroştiinţei aşa cum o ştim acum, şi anume transcendarea graniţelor disciplinelor tradiţionale „(Cowan, Harter & Kandel, 2000, pp. 344, 345) Mai mult, E.R. Kandel, laureat al Premiului Nobel pentru Fiziologie şi Medicină în 2000, afirmă explicit că: „În ultima parte a secolului XX, studiul creierului s-a mutat de pe o poziţie periferică în corpul ştiinţelor biologice şi psihologice pentru a deveni un câmp interdisciplinar care acum ocupă o poziţie centrală în fiecare dintre aceste discipline". (Kandel, 2000, pp.

1113)

3 Din motive inerente traducerii în limba română a termenului de *neuroscientist,* trebuie să folosim sintagma de specialist în neuroştiinţe.

11

Neuroştiinţele sunt, deci, un prototip al ştiinţei contemporane care nu mai găseşte justificare unor domenii ermetice atât timp cât acestea sunt, de fapt, interesate de aspecte diferite ale aceleaşi probleme şi care poate beneficia mai mult dintr-o abordare conjugată. Prin urmare, neuroştiinţele asigură un cadru teoretico-experimental pentru înţelegerea structurii şi funcţiei creierului în contextul comportamentului şi evoluţiei. Această delimitare ne permite în continuare luxul unei digresiuni despre ştiinţa contemporană.

Credem că ştiinţa de astăzi şi-a maturat aparatul metodologic pentru a trece de la o abordare condusă de metodă, după care ai un spectru de probleme pe care îl poţi studia cu o anumită metodă dezvoltată în interiorul unui domeniu, la o abordare condusă de problemă. Din anii ’70 neuroştiinţele au început să liciteze probleme legate de studiul creierului şi comportamentului, progresele enorme care au rezultat fiind susţinute de echipe multidisciplinare care au propus testarea unor metode din fiziologie, biofizică, biochimie în soluţionarea acestor probleme. La început, în anii ’50—60, neuroştiinţele s-au bazat mai mult pe neuroanatomie şi electrofiziologie, rupându-se oarecum de biologie, dar explozia experimentală din genetică şi biologia moleculară au redus o mare parte din problemele majore ale neuroştiinţelor la limbajul universal al biochimiei (Kandel, 2000; Jesseil *&* Kandel, 1998). De pildă, acest volum exemplifică modul cum o problemă ca dezvoltarea sistemului nervos a evoluat din anii ’90, mai ales, de la o abordare descriptivă ia ana moleculară.

Filosofia ştiinţei nu a mai putut aproxima ritmul acestor transformări. Nici ea nu a rămas apanajul licenţiaţilor în filosofie. Filosofia ştiinţei contemporane este acum făcută chiar de cercetători şi ia în considerare mai ales impactul descoperirilor asupra dinamicii comunităţii de cercetare şi asupra nespecialiştilor (vezi: Calder, 19704). Ne putem închipui că ştiinţele evoluează prin revoluţii ştiinţifice, trecând prin perioade preparadigmatice, perioade paradigmatice de stabilitate a principiilor şi problemelor care conduc

cercetarea într-un domeniu, urmate de perioade de criză şi de apariţia unei noi paradigme (vezi: Kuhn, 1976). Aceasta este o doar descriere retuşată, dar adecvată a evoluţiei ştiinţei *prin metodă.* Dacă ne uităm însă la evoluţia ştiinţei prin obiectul de studiu, vedem că ea a fost marcată la sfârşitul secolului trecut de recunoaşterea unor preocupări comune mai multor domenii (Cowan, Harter & Kandel, 2000). Acesta este un fenomen care a fost determinat nu de regularitatea progreselor metodologice dintr-un domeniu, ci de membri comunităţilor ştiinţifice şi de avantajele pe care le-a oferit colaborarea fiziologilor, biologilor, psihologilor, fizicienilor, chimiştilor pentru a câştiga granturi pentru finanţarea unui program de cercetare. Ştiinţele nu sunt secte, iar oamenii de ştiinţă din diverse domenii nu sunt din specii diferite!

4 „Lucrând în izolare profesională, niciun psiholog sau chimist sau neurochirurg sau cercetător al vieţii animale nu ar putea arăta mai mult de o faţetă a creierului. În trecut, aceasta a condus la teorii foarte naive, justificând izolat puterea şi complexitatea minţii umane". (Calder, 1970, pp. 10)

12

În România, situaţia pare să se acomodeze, existând, cel puţin după cunoştinţele noastre, două grupuri de cercetare cu trimitere explicită la neuroştiinţe, unul la Bucureşti şi unul la Cluj-Napoca, acesta din urmă rezultat din colaborarea Departamentelor de Fiziologie şi Psihologie de la Universitatea de Medicină şi Farmacie „Iuliu Haţieganu" şi, respectiv, Universitatea „Babeş-Bolyai". Vom prezenta în continuare cele mai importante programe de cercetare din perioada în care neuroştiinţele începeau să fie recunoscute în Statele Unite.

Una din primele încercări de a depăşi graniţele tradiţionale dintre psihiatrie şi ştiinţele fundamentale care se ocupă de studiul sistemului nervos şi al comportamentului a fost reunirea unei echipe interdisciplinare de către W. McKenzie Rioch la Institutul Militar de Cercetare Walter Reed. Colectivul de cercetare era compus din neuroendocrinologi, psihiatri cu o abordare experimentală, psihologi, neuroanatomişti şi neurofiziologi. Din grupul lui Rioch. au tăcut parte şi W.J.H. Nauta, unul din cei mai cunoscuţi neuroanatomişti, şi D. Hubel, pe atunci la studii postdoctorale şi, mai târziu (1981), laureat al Premiului Nobel pentru Fiziologie şi Medicină.

Eforturile lui Rioch au fost continuate de F. Schmitt, care se

crede că a introdus termenul de neuroştiinţe şi care a înfiinţat Programul de Cercetare în Neuroştiinţe (NRP, *Neuroscience Research Program).* NRP a fost un program interdisciplinar şi interuniversitar care a reunit specialişti din chimie, fizică, imunologie, genetică şi biologie moleculară, domenii care Schmitt a apreciat că vor avea un impact major asupra neuroştiinţelor. În timpul derulării sale, programul a sponsorizat conferinţe şi programe de vară pentru studenţi. Buletinele publicate**3** sunt şi acum citate foarte mult. Scopul declarat a lui Schmitt (1963) a avut următoarele premise:

„Accesul la cunoştinţele precise din genetica moleculară şi imunologie – spargerea codului molecular – a rezultat din interacţiunea productivă dintre fizică şi chimie cu ştiinţele naturale [/z/e *sciences}.* Pare acum posibil de a atinge progrese revoluţionare similare în înţelegerea minţii umane". (Schmitt, *apud.* Swazey, Worden & Adelman, 1975)

Primul departament de neurobiologie a fost înfiinţat în 1967, de către S. Kuffler, la Universitatea Harvard. Kuffler era din 1952 şeful laboratorului de neurofiziologie de la Institutul Wilmer pentru Studierea Ochiului *(Wilmer Eye Institute)* unde adunase un colectiv de tineri cu diferite specializări, dar toţi cu preocupări în neurobiologie. Când, în 1959, Kuffler a fost invitat să fie şeful laboratorului de neurofiziologie de la Departamentul de Farmacologie al Universităţii Harvard, acesta a luat cu el patru tineri care a prevăzut corect că vor face cercetări de pionierat: D. Hubel şi T. Wiesel, porecliţi „băieţii cu creierul" şi E. Furshpan şi D. Potter, „băieţii cu membranele". Ulterior, s-a alăturat şi enzimologul E. Kravitz, care se presupunea că ar fi trebuit să traducă totul în limbajul biochimiei. Universitatea le-a oferit însă doar ranguri de cercetare lui Hubel şi Wiesel, care fuseseră lectori la Institui Wilmer. Eforturile celor şase au

Buletinele se numeau *Neuroscience Research Program Bulletins.*

fost însă încununate cu punerea la punct a celui mai bun laborator de neurofiziologie din Statele Unite şi înfiinţarea Departamentului de Neurobiologie. Toţi cei şase au fost numiţi în scurt timp profesori, ca o recunoaştere promptă a cercetărilor lor. Valul de departamente de neurobiologie înfiinţate a condus la formarea în 1968 a Societăţii de Neuroştiinţe, ai cărei fondatori au fost psihologul N. Mii Ier, biochmistul R. Gerard şi neurofiziologul V. Mountcastle. De

la prima întâlnire la care au participat 600 de membri, Societatea de Neuroştiinţe avea în 1990 peste 20 de mii de membri activi. Până în 1968, psihologii erau asociaţi Societăţii Americane de Psihologie, neurofiziologii erau afiliaţi la Societatea Americană de Fiziologie, neuroanatomiştii la Societatea Americană de Anatomie, iar biochimiştii erau asociaţi Societăţii Americane de Biochimie. Sinteza rezultată din această colaborare a susţinut nu va! de cercetări care au condus în 1978 la apariţia unei reviste oficiale de sinteze de neuroştiinţe, e vorba de *Annual Review of Neuroscience.* Acum, revistele de neuroştiinţe sunt printre cele mai numeroase; ca probă, invităm cititorul să baleieze bibliografia din această carte.

1.4 Neuroştiinţele cognitive şi neuroimagistica funcţională

Preocupările moderne de a integra nivelurile de investigaţie biologic şi cognitiv au o istorie marcată, credem noi, de concepţia lui Ramón y Caja! asupra funcţionării cortexului cerebral (pentru detalii despre precursori, vezi: Sejnowski & Smith-Churchland, 1990, pp. 300 – 301). Nu mai departe de principiul remodelării sinaptice, care este discutat ca posibilă bază celulară a învăţării, a fost sugerat de S. Ramón y Cajal. Cei care au pus fundamentele experimentale ale neuroştiinţelor cognitive au fost V. Mountcastle, D. Hubel şi T. Wiesel, care au elucidat cum anume organizarea celulară şi proprietăţile funcţionale ale celulelor din cortexul somato-senzitiv şi vizual sunt relaţionate cu funcţia sistemelor corticale corespunzătoare.

Manifestul din anii.'60 al psihologiei cognitive, ai cărui reprezentanţi de seamă sunt U. Neisser, N. Chomsky, H. Simon, G. Mii Ier, J. Bruner, a susţinut explicit că viaţa noastră mintală este mai complexă decât ceea ce reuşise să descrie paradigma behavioristă şi că procese ca percepţia sunt determinate de prelucrări informaţionale susţinute de creier. Abordarea cognitivă ce s-a impus ca paradigmă care este şi astăzi fecundă are la bază presupunerea că fiecare act perceptiv sau motor dispune de o reprezentare internă susţinută de un anumit aspect (pattern) de activitate neuronală. Această presupunere era convergentă cu studiile din acea perioadă ale lui Mountcastle, Hubel, Wiesel şi alţii, prin care se arăta cum reprezentarea internă a unui comportament specific poate fi studiată electrofiziologic la nivelul unei singure celule din cortexul cerebral intact al unor primate în stare de veghe, care sunt învăţate să execute anumite sarcini motorii sau perceptive (pentru detalii, vezi: Mountcastle, 1997; pentru detalii

despre istoria neuroştiinţelor cognitive, vezi: Milner, Squire & Kandel, 1998). Dezvoltarea metodelor prin care pot fi investigate funcţiile creierului uman *in vivo* este însă

progresul cheie care a permis recunoaşterea şi expansiunea neuroştiinţelor cognitive.

Acestea sunt metodele imagistice de explorare funcţională a creierului ce au evoluat de la metoda deoxiglucozei (2-DG) radioactive şi tomografia computerizată (CT) până la tomografia de rezonanţă magnetică funcţională (RMNf6) şi tomografia cu emisie de pozitroni şi tehnicile derivate, cum ar fi tomografia cu emisie a unui foton singular (SPECT, *single photon emission tomography)* şi unele metode imagistice optice. Aceste metode, ne referim la PET şi RMNF, au permis investigarea funcţionării creierului uman în anumite condiţii comportamentale experimentale, în paralel cu studierea electrofiziologică a activităţii neuronale în aceleaşi condiţii la primate, de pildă. Ele au la bază relaţia dintre consumul cerebral de energie şi activitatea neuronală, legătură sugerată pentru prima dată de C.S. Roy şi C.S. Sherrington în 1890. Mai precis, aceste tehnici folosesc măsuri ale metabolismului şi circulaţiei cerebrale pentru a se putea face inferenţe despre activitatea celulară a creierului (pentru detalii, vezi: Gusnard & Raichle, 2001). Vom aborda în continuare unele date mai recente privind relaţionarea activităţii neuronale cu parametrii de circulaţie şi metabolism cerebrale măsuraţi prin metodele neuroimagistice funcţionale. Se poate spune că studiile ale căror concluzii le vom descrie succint în continuare au făcut trecerea de la o perioadă în care numai presupuneam ce măsurăm prin PET şi RMNF la una în care avem ce puţin probe calitative care să conducă inferenţele despre funcţia cerebrală (pentru mai multe detalii legate de metoda 2-DG, vezi: Sokoloff, 198 la, b; Sharp, Kilduff & Heller, 1981; despre CT, PET şi RMNF, vezi: Posner & Raichle, 1994; Raichle, 1998; Opere, 1999; Olteanu, Lupu & Miu, 2001, pp. 12 – 13).

Creierul reprezintă circa 2% din greutatea întregului corp, dar, în pofida greutăţii sale reduse, acesta solicită aproximativ 20% din cantitatea de oxigen consumată. Această rată metabolică crescută este relativ constantă în condiţii cognitiv-comportamentale foarte variate. Aşa cum am menţionat, metode ca PET şi RMNF au la bază presupunerea că activitatea neuronală marcată dintr-o anumită

regiune a creierului este asociată cu creşterea irigaţiei cerebrale în acea zonă. Consumul de oxigen nu creşte însă semnificativ, rezultând mai mult oxigen adus de hemoglobina faţă de cel care este consumat, acest „exces" reflectându-se formal în semnalul dependent de nivelul sangvin de oxigen (BOLD, *blood-oxygen-level-dependeni)* (pentru detalii despre raportul de distribuire a oxigenului *[oxygen extraction fraction]*, vezi: Gusnard & Raichle, 2001, pp. 686). Se ştie însă că, odată cu creşterea irigaţiei cerebrale a unei anumite zone, creşte aproape liniar şi consumul de glucoza, ceea ce indică faptul că creşterea metabolismului este determinată, cel puţin parţial, de creşterea glicolizei astrocitare necesară mai ales pentru rata de reînnoire (turnover) a glutamatului.

6 Acronimul anglo-saxon pentru tomografia de rezonanţă magnetică funcţională este FMRI, de la *funcţionat magnetic resonance imaging.*

Rata de reînnoire a glutamatului, principalul neurotransmiţător excitator din sistemul nervos central se referă mai ales la recaptarea acestuia în porţiunea presinaptică, glutamatul

15

Neurofiziologii au fost interesaţi de la început de ceea ce indică aceşti parametri măsuraţi prin PET şi RMNF. Până de curând, existau doar dovezi preliminare care indicau că menţinerea echilibrului dintre activitatea excitatorie şi inhibitorie la nivelul sinapselor ar fi responsabilă de creşterea irigaţiei cerebrale sau că energia consumată de neuroni corelează cu activitatea electrică (pentru detalii, vezi: Raichle & Gusnard, 2002). Alte studii au indicat corelaţia aspectului de activare metabolică a unei zone cerebrale (irigaţie sangvină şi consum de glucoza marcate asociate cu un consum de oxigen relativ constant) cu potenţialele de câmp locale *(local field potentials),* un parametru electrofiziologic reprezentat de o medie ponderată a curenţilor de la nivelul dendritelor şi corpurilor celulare pre- şi postsinaptice, care includ, probabil, şi potenţialele de vârf ale interneuronilor mici (pentru detalii, vezi: Logothetis & colab., 2001). Cercetări foarte recente au efectuat în paralel înregistrarea extracelulară a activităţii neuronale din cortexul cerebral, modificări în consumul de oxigen şi modificări ale fluxului de glutamat corelate şi cu rata de descărcare a neuronilor din cortexul cerebral de la şobolanul anesteziat. Stimularea somato-senzitivă a determinat o modificare a consumului de oxigen

proporţională cu modificarea fluxului glutamatergic şi cu modificarea frecvenţei potenţialelor de vârf. Valorile maxime ale consumului de oxigen corelează liniar cu frecvenţa potenţialelor de vârf (pentru detalii, vezi: Smith & colab., 2002; Hyder, Rothman & Shulman, 2002). Aceste cercetări pe care le vom detalia altundeva au confirmat relaţia presupusă dintre activitatea neuronală, irigaţia cerebrală şi metabolismul neuronal şi oferă o bază neurofiziologică pentru explorarea funcţională a creierului uman prin metode neuroimagistice.

Ştiinţele computaţionale au oferit de asemenea, o direcţie de dezvoltare pentru neuroştiinţele cognitive. Proiectarea unor reţele neuronale artificiale (neuromimetice) cu ajutorul unor softuri specifice a făcut posibilă modelarea proprietăţilor integrative ale neuronilor individuali şi a activităţilor unor populaţii de neuroni (pentru detalii, vezi: Miclea, 1999, pp. 38 – 46; Opere & Andras, 1998). Aceste reţele conţin unităţi care reprezintă, de obicei, neuroni individuali, iar proprietăţile şi performanţa reţelei sunt modelate prin modificarea tăriei dintre legături (reprezentări ale legăturilor sinaptice) şi a ponderii acestora. Performanţa reţelei depinde, în primul rând, de arhitectura acesteia, adică de modul în care sunt organizate unităţile şi legăturile. Această abordare a permis modelarea unor proprietăţi funcţionale ale creierului şi chiar a unor tulburări de dezvoltare a sistemului nervos şi a oferit perspective teoretice importante pentru conceperea activităţii reţelelor şi circuitelor nervoase (pentru detalii, vezi: Thomas & Karmiloff-Smith, 2002; Elman & colab., 1996; Sejnowski & Smith-Churchland, 1990). Aceste studii au fost însă criticate în ultimul timp pentru că s-au îndepărtat de datele oferite de cercetările de neurofiziologie care instruiesc, de obicei, proiectarea reţelelor neuromimetice (Elman, 2001). Există însă o categorie de modele ale activităţii neuronale care rămân aproape de datele despre funcţionarea recaptat justificând aproape 80% din cantitatea din compartimentul activ de neurotransmiţător al sinapsei.

creierului şi au, deci, o mai mare validitate ecologică (vezi, de exemplu: Bear, 1996 şi Shouval, Bear & Cooper, 2002 şi referinţele).

1.5 Genomică, neuroembriologia moleculară şi neurobiologia evoluţionistă: Triada imperială

Descrierea la nivel molecular a oricărui fenomen biologic este

platforma de pe care orice mecanism subiacent poate fi redus la limbajul universal al biochimiei. Dezvoltarea tehnicilor moleculare din ultimele două decenii, mai ales, a permis aplicarea lor în biologia dezvoltării, în imunologie *şi* chiar în studierea comportamentului prin identificarea genelor care interacţionează pentru a produce un anumit efect comportamental (vezi: Lander & Schork, 1994; dar şi: Collins, 1999; Holtzman & Marteau, 2000). Este indiscutabil că cele mai sofisticate şi mai bine finanţate domenii din neuroştiinţe sunt astăzi genomică şi biotehnologia, prima ghidând în mod tradiţional pe cea de-a doua. Astfel, secvenţierea genomului uman (Venter & colab., 2001), dar şi a genomului unor sistemelor experimentale cum ar fi musculiţa *Drosophila melanogaster* sau nematodul *Caenorhabditis elegans* au oferit perspectiva identificării rolului fiziologic al proteinelor şi a identificării relaţiei dintre mutaţia anumitor gene şi unele fenotipuri (pentru o introducere în genomică, vezi: Bentley, 2000). O abordare tradiţională utilă acestei ultime direcţii este monitorizarea mutaţiilor care corelează cu fenotipuri defective dintr-un anumit punct de vedere. Genetica tradiţională permite acum intervenţia inversă, adică modificarea expresiei unei gene de interes care să determine urmărirea rolului pe care îl joacă produsul său proteic (pentru o sinteză, vezi: Picciotto & Wickman, 1998).

„Copilul răsfăţat" al genomicii moderne este, cel mai probabil, neuroembriologia care, printr-o schimbare radicală de paradigmă, şi-a câştigat titlul de „moleculară". Aplicarea metodelor de studiu la nivel molecular la problema dezvoltării embrionare a sistemului nervos a produs, în mai puţin de zece ani, un număr enorm de date experimentale. Într-adevăr, chiar metodele moleculare şi-au demonstrat fineţea în intervenţii experimentale spectaculoase în care, prin modificarea expresiei unor gene, a putut fi controlată inducerea unor întregi structuri nervoase. Poate neuroembriologia avea mai multă nevoie decât orice alt domeniu de o schimbare de paradigmă pentru că, s-a confirmat în ultimii ani, identificarea primordiului şi urmărirea dezvoltării unor structuri nervoase pot fi inadecvate, dacă ne orientăm numai după criterii morfologice (pentru exemple, vezi: Puelles, 1995, 2001 şi următorul capitol). Cheia revoluţiei moleculare în neuroembriologie a fost observaţia care a indicat că teritoriul de expresie al unor gene este de multe ori specific unui câmp de creştere. Astfel, o genă exprimată în populaţia de celule din care se va forma o

structură nervoasă este o lentilă mult mai bună pentru a identifica primordiul acelei structuri decât presupunerile bazate pe dezvoltarea morfologică a unui segment din tubul neural. Mai mult, unele gene cum ar fi cele care codează unii factori de creştere controlează cascade moleculare care s-a arătat că determină inducţia unor structuri cum ar fi prozencefalul.

17

mezencefalul sau cerebelul. Să notăm că aspiraţia unora dintre fondatorii neuroembriologiei, cum ar fi H. Spemann şi C.H. Waddington, a fost de a descoperi *interacţiunea* dintre ţesuturile embrionare, care controlează forţele inductive care pun în mişcare creşterea embrionară a sistemului nervos. Ori neuroembriologia morfologică nu a dezvăluit mecanismele care impun programul de dezvoltare embrionară. Neuroembriologia morfologică nu a răspuns la întrebarea fundamentală a oricărei ştiinţe: „de ce?". De pildă, de ce neuroectodermul se formează tocmai din porţiunea de ectoderm de deasupra mezodermului? Neurombriologia moleculară îţi oferă răspunsuri, îţi descoperă mecanisme, este explicaţie, nu descriere.

Creşterea puterii explicative a exerciţiilor de neurobiologie evoluţionistă a fost susţinută de genomică şi de neuroembriologia moleculară. Genomică a arătat că, de pildă, 70% din genele identificate la om au gene echivalente (ortoloage), din punct de vedere al secvenţei nucleotidice, la nematodul *C. elegans.*

Fig. 1.3 *Miracolul descoperirii. În centru: structura tridimensională a moleculei de ADN. Perrutz, Bernal şi Crick la deschiderea Laboratorului de Biologie Moleculară de la MRC Centre, Londra, în 1962.*

Neuroembriologia moleculară a demonstrat mai departe că proteinele codate de unele din aceste gene au chiar aceeaşi funcţie la *Drosophila,* la *C. elegans* şi la om şi că fenotipuri defective pentru o anumită genă, studiate la şoarece, de pildă, pot fi salvate prin inducerea expresiei genei ortoloage de la *Drosophila,* de pildă. Embriologul K.E. von Baer oferea la sfârşitul secolului XIX probe morfologice care susţineau similaritatea proiectului embrionar la diferite specii. La jumătatea secolului trecut, embriologul suedez B. Källen accentua similaritatea evidentă dintre organizarea trunchiul cerebral şi a talamusului la toate vertebratele. Cele trei domenii de cercetare, genomică, neuroembriplogia moleculară şi neurobiologia

evoluționistă, au confirmat împreună teza lui Bauer și Kăllen, fiind astăzi clar că creiere mai mari și cu circuite mai complicate nu înseamnă neapărat mai multe

gene pentru a susține această modificare. Genomul a evoluat prin mărirea redundanței genetice, adică, probabil, prin duplicarea genelor, și creșterea numărului de interacțiuni între gene, cu efecte fenotipice specifice. Într-adevăr, țesutul nervos este costisitor pentru evoluție din multe puncte de vedere (genetic, metabolic ș.a.). Evoluția sistemului nervos de la nevertebrate până la primate este elegantă în primul rând pentru că a dispus de continuitate. Dezvoltarea și evoluția creierului ne învață că, în natura, niciun proiect nu este abandonat fără a se selecta mai întâi cea mai bună copie. Dacă la aceasta adăugăm convingerea fundamentală a fiziologilor că nimic nu este inutil și că, cel puțin la nivelul sistemului nervos, nu există atavisme, ne putem închega o concepție realistă și actualizată despre creier. Capitolele următoare nu sunt decât o încercare de a informa o asemenea concepție.

1.6 Rezumat

Neuroștiințele sunt astăzi unul dintre cele mai avansate domenii experimentale. Încă primele concepții moderne asupra organizării creierului au impus această temă ca pe o provocare a științei umane. Elucidarea modului în care creierul elaborează cogniția și coordonează comportamentul ar fi, în ultimă instanță, chiar și un câștig cultural important. Progresul timpuriu al neuroștiințelor a fost condus de punerea la punct a unor metode de investigare a organizării structurale și funcționale a creierului. Se poate considera că era modernă a neuroștiințelor a fost marcată de confirmarea doctrinei neuronale și a existenței sinapselor și dovedirea mecanismului cuantic de comunicare sinaptică. Controversa în jurul doctrinei neuronului și a teoriei reticulare a pus în valoare zelul experimental și verva argumentativă a numeroși pionieri ai neuroștiințelor, dar trei dintre protagoniști au fost S. Ramón y Cajal, C. Golgi și G. Marinescu. Reunirea primelor echipe interdisciplinare în unele laboratoare de neurofiziologie și publicarea unui val de studii care au probat eficiența colaborării dintre diverși specialiști pentru studierea creierului au condus la înființarea în jurul anilor ’70 a Societății de Neuroștiințe și a primului jurnal științific de sinteze de neuroștiințe.

Cercetările asupra mecanismelor celulare care sunt active în diferite condiţii comportamentale şi, mai ales, perfecţionarea metodelor neuroimagistice funcţionale au asigurat succesul unor programe de cercetare, grupate sub denumirea de neuroştiinţe cognitive, care au drept scop integrarea nivelurilor biologic şi cognitiv de studiere a creierului. Studii foarte recente au clarificat realitatea neurofiziologică pe care o studiem prin metode cum ar fi PET sau RMNF. Mai recent, acumulările metodologice din genetică şi biologia moleculară au permis lansarea unor programe de cercetare monumentale, unul dintre acestea fiind Proiectul Genomului Uman. Nu numai atât, aplicarea metodelor moleculare în diverse domenii a determinat schimbări paradigmatice de proporţii în neuroembriologie, care a avansat de la o paradigmă morfologică la una moleculară şi în neurobiologia evoluţionistă, care şi-a întărit puterea explicativă. Toate aceste progrese arată că, atât timp cât structura şi funcţionarea creierului sunt o realitate

19

explicabilă cu mijloace ştiinţifice, complexitatea insurmontabilă a creierului, invocată de atâtea ori, este un clişeu.

20

REFERINŢE BIBLIOGRAFICE:

— Referinţe recomandate Referinţe de mare interes

Bear, M.F. (1996) *A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex.*

Porc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 13453 – 13459 Bentley, D.R. (2000) *Decoding the human genome sequence.* Hum. Mol. Genet. 9.

2353 – 2358 Bracegirdle, B. (1986) *A history of microtechnique,* Science Heritage Ltd.

Lincolnwood Bullock, T.H., Northcutt, R.G., Bodznick, D. A. (1982) *Evolution of electroreception.* Trends Neurosci. 5, 50 – 53 Calder, N. (1970) *The Mind of Man.* The Viking Press, New York Cole, K.S. (1949) *Dynamic electrica! characteristics of the squid axon membrane.*

Arch. Sci. Physiol. 3, 253 – 258 Collins, F.S. (1999) *Medical and societal consequences of the human genome project.* N. Engl. J. Med. 341, 28 – 37 Conţi, F., Neher, E. (1980) *Single channel current recordings of K currents în squid axons.* **Nature** 285, 140143 „Cowan, W.M., Harter, D.H., Kandel, E.R. (2000) *The emergence of modern neuroscience: Sotne*

implications for neurology and psychiatry. **Annu.** Rev. Neurosci. 23, 343 – 391

Una din ultimele sinteze publicate asupra istoriei neuroştiinţelor. Capitolul conţine o prezentare concisă a începuturilor moderne a se neuroştiinţelor, cu accent asupra dezvoltărilor care au avut şi au implicaţii asupra neurologiei şi psihiatriei. Textul este valoros şi pentru că este scris de trei dintre personalităţile reprezentative pentru neuroştiinţele contemporane şi, în plus, oameni care au trăit istoria devenirii acestui domeniu şi pot spune, deci, povestea „din interior".

Crick, F.H.C. (1962) *On the genetic code.* Physiol. Med. (Prelegere Nobel)

Textele lui Crick sunt, de obicei, într-o scriitură fermecătoare, presărată cu reflecţii. Şi în acest discurs de la decernarea Premiului Nobel pentru Fiziologie şi Medicină, Crick prezintă succint istoria descoperirii structurii moleculei de ADN şi analizează posibilele influenţe asupra altor ştiinţe ale naturii şi asupra conceperii ştiinţei moderne, în general.

Crick, F.H. e. (1980) *Thnking about the brain.* Sci. Am. 241, 181 – 188

Dale, H.H. (1936) *Some recent extensions of the chemical transmission of the effects ofnerve impulses.* Physiol. Med. (Prelegere Nobel)

„Delbrück, M. (1969) *A physicist's renewed look at biology – Twenty years later.* Physiol. Med. (Prelegere Nobel)

Prezentarea este de interes pentru noi mai ales pentru că este încercarea timpurie a unui fizician de a întrevedea contextul în care fizica şi chimia se vor apleca din nou asupra biologiei.

Eccles, J. C, Eccles, R.M., Fatt, P. (1956) *Pharmacological investigations on a central synapse operated hy acetyicholine.* J. Physiol. (Londra) **13**3, 154 – 169

21

Eccles, J. C, Fatt, P., Koketsu, K. (1954) *Cholinergic and inhibitory synapses în\ pathway from motor-axon collaterals to motoneurons.* J. Physiol. (Londra 126, 524 – 562

Elman, J. (2001) *Connectionist approaches to psycholingvistics, languag acquisition, and lingvistic theory.* **8th** International Summer School îi

Cognitive Science, Sofia, Bulgaria

Elman, J., Bates, E., Johnson, M., Karmiloff-Smith, A., Parisi, D., Plunkett, KJ: „r (1996) *Rethinking innateness: A connectionist perspective on development*

MIT Press/Bradford Books, Cambridge Golgi, C. (1906) *The neuron doctrine – Theory and facts.* Physiol. Med.

(Prelegere Nobel), pp. 189 – 217, C. Golgi trece în revistă probele în favoarea teoriei reticulare. Este de gustat stilul detaşat şi sec în care cercetătorul Golgi tranşează argumentele ştiinţifice. De ce nuj în ultimă instanţă, o prezentare a omului Golgi. Gusnard, D.A., Raichle, M. E. (2001) *Searching for a baseline: Funcţiona imaging and the resting human brain.* Nat. Rev, Neurosci. 2, 685 – 694 Hodgkin, A.L. (1951) *The ionic basis of electrica! activity în nerve and muscle.*

Biol. Rev. 26, 339 – 409

Holtzman, N.A., Marteau, T.M. (2000) *Will genetics revoluţionize medicine?* NJ

Engl. J. Med. 343, 141 – 144

„Hyder, F., Rothman, D. L „Shuiman, R.G. (2002) To*tal neuroenergetics support... of localizând brain activity: Implications for the interpretations of FMRL.* \ Porc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 10771 – 10776

Unul din studiile recente care corelează rata metabolică a consumului cerebral de oxigen (CMR02) cu frecvenţa relativă a potenţialelor de vârf ale unor populaţii neuronale (A v/v) în timpul stimulării somato-senzitive la şobolani anesteziaţi. Studiul are implicaţii atât pentru înţelegerea modului cum neuronii efectuează procesarea informaţiei, cât şi pentru interpretarea măsurătorilor prin RMNF. Vezi şi studiul complementar: Smith & colab. (2002) *Porc. Natl. Acad. Sci. USA* 99.10765 – 10770

Jessell, T.M., Kandel, E.R. (1998) *Introduction: One decade of Neuron, six decades of neuroscience.* Neuron 20, 367 – 369

„Kandel, E.R. (2000) *Neuroscience: Breaking down scientific barriers to the study of brain and mind.* Science 290, 1113 – 1121

O prezentare detaliată a istoriei neuroştiinţelor, cu o perspectivă asupra premiselor care ne-ar permite astăzi investigarea relaţiei dintre creier şi cogniţie şi comportament. Abordarea lui Kandel, aici, ca şi în alte articole, constă din a prezenta progresele neuroştiinţelor ca o succesiune de apropieri între domenii tradiţionale

cum ar fi fiziologie, psihologia, fizica, chimia.

Kapp, B.S., Schwaker, J.S., Driscoil, P.A. (1985) *Frontal cortexprojections to the amygdaloideentral nucleus in the rabbit.* Neuroscience 15, 327 – 346

Katz, B., Miledi, R. (1972) *The statistica! nature of the acetylcholine potenţial and its molecular components. J.* Physiol. (Londra) 224, 665 – 699

Kuhn, T. (1976) *Structura revoluţiilor ştiinţifice.* Ed. Ştiinţifică şi Enciclopedică, i Bucureşti

22

Landei", E.S., Schork, N.J. (1994) *Genetic dissection of complex traits.* Science

265, 2037 – 2048 Loewi, O. (1936) *The chemical transmission of nerve action.* Physiol. Med.

(Prelegere Nobel) „Logothetis, N.K., Pauls, J., Augath, M., Trinath, T., Oeltermann, A. (2001)

Neurophysiological investigations of the basis of the FMRI signal. Nature

412, 150 – 157

Unul din primele studii care asociază un tip de activitate neuronală, este vorba de potenţialele de câmp locale (LFP), cu indici de metabolism şi circulaţie cerebrală măsuraţi prin RMNF. Lorente de No, R. (1934) *Studies of the structure of the cerebral cortex. II.*

Continuation of the study of the Ammonic sistem. J. Psychol. Neuroi.

Leipzig 46, 113 – 177 Lorente de No, R. (1938) *Synaptic stimulation of motoneurons as a motor process.*

J. Neurophysiol. 1, 195 – 206 Marinesco, G. (1895) *Theorie des neurones. Application au processus de degenerescence et d'atrophie dans le sisteme nerveux.* La Presse Medicale.

3, 812

Printre primele sinteze care afirmă explicit că unitatea structurală şi funcţională a sistemului nervos este neuronul, nu reţeaua. O bună ancoră a controverselor de dinainte de recunoaşterea validităţii doctrinei neuronului. Marinesco, G. (1909) *La Celule Nerveuse.* Octave Doins et Fils, Paris Marinesco, G. (1930) *Recherches sur la structure physico-chymique de la celule nerveuse et sur le role des ferments dans les phénomènes de la vie du neurone.* Rev, Beige de Sci.

Med. 2 Miclea, M. (1999) *Psihologie cognitivă. Modele teoretico-experimentale.* Polirom.

Iaşi Mâiner, B., Squire, L.R., Kandel, E.R. (1998) *Cognitive neuroscience and the study ofmemory.* Neuron 20, 445 – 468 „Mountcastle, V.B. (1997) *The columnar organization of the neocortex.* Brain

120, 701 – 722

O excelentă prezentare a organizării columnare a creierului. Sunt discutate implicaţiile funcţionale ale acestui tip de organizare a neuronilor în izocortex. Nauta, W.J.H., Gygax, P.A. (1954) *Silver impregnation of degenerating axon terminals in the central nervous sistem.* Stain. Technol. 26, 5 – 11 Olteanu, A., Lupu, V. (2000) *Neurofiziologia sistemelor senzitivo-senzoriale.* Presa

Universitară Clujeană, Cluj-Napoca Olteanu, A., Lupu, V., Miu, A. (2001) *Neurofiziologia comportamentului uman.*

Presa Universitară Clujeană, Cluj-Napoca „Opere, A. (1999) *Imaging techniques on neurosciences.* Cogniţie, Creier.

Comportament 3, 363 – 370

O prezentare contrasă a metodelor de explorare funcţională a creierului, însoţită de analiza implicaţiilor aplicării acestor metode asupra neuroştiinţelor. Sinteza reprezintă o introducere în problematica care pune în valoare metodele neuroimagistice funcţionale în cercetarea fundamentală.

23

Opere, A., András, P. (1998) *Amnesia: Neuropsychoiogka! interpretation and artificial neural network simulation.* Cogniţie, Creier, Comportament 2, 315 – 334

Pappas, G.D., Purpura, D.P. (1972) *Structure and function of synapses.* Raven Press, New York

„Picciotto, M.R., Wickman, K. (1998) *Using knockout and transgenic mice to study neurophysiology andbehavior.* Physiol. Rev. 78, 1131 – 1163 O prezentare a tehnicilor moderne prin care sunt obţinute linii de animale experimentale modificate genetic (linii transgenice sau linii *knock-out* la care expresia unei gene a fost anulată). Un text comprehensiv şi, deci, o bună introducere în metodele moleculare moderne. Unul din primele articole în care este analizată puterea pe care o capătă abordarea moleculară în fiziologie.

Posner, M., Raichle, M. (1994) *Images of Mind.* Sci. Am. Library,

New York

°Puelles, L. (1995). *A segmentai morphological paradigm for understanding vertebrate for ebrains.* Brain. Behav. Evol. 46, 3! 9 – 337 O sinteză excelentă care convinge pe cei obişnuiţi cu paradigma morfologică din neuroembriologie că abordarea moleculară oferă avantaje care au făcut din acest domeniu unul prin excelenţă experimental. Autorul, cel mai influent susţinător al paradigmei moleculare în neuroembriologie, oferă o grilă de principii cu care pot fi integrate numeroasele date experimentale apărute în ultimul deceniu. Manifestul unei revoluţii ştiinţifice.

Puelies, L. (2001). *Brain segmentation and forebrain development în amnioteş.* Brain Res. Bull. 55, 6, 695 – 710

Raiehle, M.E. (1998) *Behind the scenes of funcţional brain imaging: a historical andphysiologicalperspective.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 765 – 772 Sunt prezentate principiile metodelor de explorare funcţională a creierului şi tipul de designuri experimentale care pot fi asociate acestor metode.

Raichle, M.E., Gusnard, D.A. (2002) *Appraising the brain's energy budget.* Porc. Nati. Acad. Sci. USA 99, 10237 – 10239

Ramón y Cajal, S. (1890) *Textura de las circunvoluciohes cerebrales de los mamiferos inferioares.* Un silabus editat de S. Ramón y Cajal, Barcelona

Ramón y Cajal, S. (1892) *Observaciones anatâmicas sobre la corteza cerebral y asta de Ammon.* Actas Soc. Esp. Hist. Nat. 1, 1-13

Ramón y Cajal, S. (1899 a) *Estudios sobre la corteza cerebral humana. I. Region visual.* Rev. Trim. Micrografica 4, 1 – 63

Ramón y Cajal, S. (1899 b) *Estudios sobre la corteza cerebral humana. II. Estudio de la corteza. motriz del hombre y mamiferos superior es.* Rev. Trim. Micrografica 4, 117 – 200

Ramón y Cajal, S. (1900 a) *Estudios sobre la corteza cerebral humana. III. Region motriz.* Rev. Trim. Micrografica 5, 1-12

Ramón y Cajal, S. (1900 b) *Estudios sobre la corteza cerebral humana. IV. Estructura de la corteza acustica.* Rev. Trim. Micrografica5, 1 29 – 184

Ramón y Cajal, S. (1906) *The structure and connections of neurons.* Physioi. Med. (Prelegere Nobel), 220 – 253

Discursul lui Ramón y Cajal de la decernarea Premiului Nobel

înseamnă începutul neuroanatomiei moderne. Un document actual, valoros şi prin stilul exemplar al unui cercetător care ştie să fie actor, orator şi diplomat. Ramón y Cajal, S. (1989) *Recollections ofmy life.* MIT Press Cambridge Ramón y Cajal, S. (1991) *Degeneration and regeneration of the nervous sistem.*

Oxford University Press, Oxford „Sejnowski, T.J., Smith-Churchland, P. (1990) Brain and cognition. În: Posner.

M. (Ed.): *Foundations of Cognitive Science* (pp. 300 – 339). MIT Press.

Cambridge

Autorii accentuează necesitatea unei abordări la toate nivelurile de organizare a sistemului nervos şi, prin aceasta, previn conceperea neuroştiinţelor cognitive ca un domeniu revendicat de o parte a comunităţii de specialişti în neuroştiinţe.

Creierul trebuie investigat *unitar* de la nivel molecular până la nivel de sisteme nervoase. Sharp, F.R., Kilduff, T.S., Heller, H.C. (1981) *The 2-deoxyglucose neuroanatomical mapping technique.* Trends Neurosci.4, 44 – 47 Sherrington, C.S. (1897) The central nervous sistem. În: Foster, M. (Ed.): *A Text*

Book of Physiology. Macmillan & Co., Londra Sherrington, C. S. (1906) *The Integrative Action of the Nervous Sistem.* Yale

University Press, New Haven Sherrington, C.S. (1929) *Some funcţional problems attaching to convergence.*

Porc. Royal Soc. London B 105, 332 – 362 Sherrington, C. S. (1931) *Quantitative measurement of contraction in lowest level coordination.* Brain 54, 1 – 28 Shouval, H.Z., Bear, M.F., Cooper, L. N. (2002) *A unified model of NMDA*

receptor-dependent bidirecţional synaptic plasticity. Porc. Natl. Acad. Sci.

USA 99, 10831 – 10836 „Sinith, A.J., Blumenfeld, H., Behar, K.L., Rothman, D.L., Shulman, R. G.

Hyder, F. (2002) *Cerebral energetics and spiking frequency: The neurophysiological basis off MRI.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 10765

10770 Sokoloff, L. (198 la) *Localization of funcţional activity in the central nervous sistem by measurement of glucose utilization with radioactive deoxyglucose.* J. Cereb. Blood Flow Metab. 1, 7 – 36 Sokoloff, L. (198 lb) *The deoxyglucose method: Theory andpractice.* Eur. Neurol.

20, 137 – 145

O prezentare tehnică a metodei deoxiglucozei radiactive, făcută chiar de către cel care a perfecţionat-o. Swazey, J.P., Worden, F.G., Adelman, G. (1975) The Neurosciences: Paths of discovery. În: Swazey, J.P., Worden, F.G., Adelman, G. (Eds.): *Forging a*

Neuroscience Community: A Brief History of the Neurosciences Research

Program. MIT Press, Cambridge Thomas, M., Karmiloff-Smith, A. (2002) *Are developmental disorders like cases of adult brain damage? Implications from connectionisî modelling.* Brain

Behav. Sci. 25, 3, *sub tipar*

25

„Venter, J. C, Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R. A, Gocayne, J.D., Amânatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H. & colab. (2001) *The sequence of the human genome.* Science 291, 1304 – 1351

Prezentarea destul de tehnicistă a rezultatelor experimentale obţinute în cadrul proiectului genomului uman, mai ales pentru cei care nu sunt foarte familiari cu jargonul ştiinţific al genomicii. Însă urmărirea referinţelor reface istoria controverselor ştiinţifice de-a lungul derulării acestui proiect.

Watson, J.D., Crick, F.H.C. (1953) *Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid.* Nature 177, 964

26

Capitolul 2

MORFOGENEZA ŞI REGIONALIZAREA TIMPURIE A SISTEMULUI NERVOS

CONŢINUTUL CAPITOLULUI:

Organizarea axială şi inducţia neurală. Neurulaţia

Organizatorul istmic: Morfogeneza mezencefalului, rombencefaiului şi cerebelului

Morfogeneza şi regionalizarea măduvei spinării. Morfogeneza timpurie a sistemului nervos periferic

Morfogeneza prozencefalului

Reglarea genetică a adeziunii celulare: interfaţa molecular-celular în morfogeneza

Rezumat

Adaptarea în diverse nişe ecologice este explicaţia cea mai frecventă pentru varietatea morfologică şi funcţională a creierului la

diferite specii. Mediul nonstaţionar, ca să împrumutăm un termen din fizică, presupune flexibilitate comportamentală care este susţinută de modificări la nivelul creierului. De aici decurge că inovaţia comportamentală este importantă pentru evoluţia creierului. Noi comportamente înseamnă mijloace mai eficiente de exploatare a mediului, animalul şi specia fiind expuse astfel la noi presiuni ale selecţiei. Relaţia dintre flexibilitatea comportamentală şi evoluţia creierului este susţinută de studii care arată că, de pildă, mărimea grupului social corelează cu volumul neocortexului la primate, lilieci, carnivore şi cetacee (Reader & Laland, 2002). Un alt exemplu este corelaţia semnificativă dintre mărimea creierului şi volumul corporal, din care o mare parte este reprezentată de sistemul muscular. Evident, odată cu dezvoltarea musculaturii, şi mecanismul nervos de coordonare a sistemului muscular trebuie să evolueze, astfel că ne explicăm de ce reprezentarea motorie în cortexul motor primar se extinde (Jerison, 1991). Recapitulând, mediul solicită diversificarea comportamentelor motorii care se bazează pe dezvoltarea sistemului muscular şi a mecanismului nervos de control muscular. Pe de altă parte însă, flexibilitatea comportamentală nu oferă o explicaţie completă pentru evoluţia creierului (Finlay, Hersman & Darlington, 1998). Un creier mai mare sau mai complicat nu înseamnă neapărat comportamente mai sofisticate. Să comparăm, de pildă, o pasăre cum ar fi rândunica, cu un creier de mai puţin de un gram cu o balenă al cărui creier cântăreşte mai mult de cinci mii de grame. Ambele manifestă o diversitate admirabilă de comportamente: cântă în perioadele de împerechere, deşi rândunica adaugă şi un ritual de dans, îşi apără teritoriul, se împerechează, cresc pui şi migrează pe distanţe enorme (Finlay, Darlington & Nicastro, 2001). Evoluţia creierului ilustrează, deci, faptul că mai mare nu înseamnă în mod necesar mai complex.

27

Am precizat aceste premise pentru că, de foarte multe ori pe parcursul acestei lucrări, vom lua comportamentul ca motiv pentru studierea unui circuit nervos. În particular, acest volum încearcă să descrie dezvoltarea sistemului nervos din care mare parte se întâmplă în timpul vieţii embrionare. Un motiv pentru a studia dezvoltarea embrionară a creierului este că multe din comportamente sunt prezente încă de la naştere. De pildă, puii multor specii numite generic

precociale pot merge aproape imediat după naştere, ceea ce indică faptul că mecanismul neuronal al acestor comportamente se dezvoltă în timpul vieţii embrionare. Cu o formulă provocatoare, am putea spune că naşterea nu este un eveniment major pentru dezvoltarea sistemului nervos.

Îi gază (9, 0.5%)

liază (12, 0.7%) oxidoredudază (64, 3.7%) sintază şi sintetază (64, 3.7%)

transfer azi (70, 4.1%) \ molec. leg}atoare. (88, 5.1 %)

kinaze (69, 4%) receptor (23, 1.3%)

Izomerază (21, 1.2%) *I* hă ctroiază (80, 4.7%)

funcu e în oi ecul ar a necunoscută *(*613, 35.8%)

etizÂHte ale acizilor **nucleici (221, 12** 5%)

factor rjs transcripţie (81, 4.7%)

proteine **te & nsferfransportor** (

proteine virale (4, 0.2%)

aleator (72, 4.2%) adeziune celulară (11, 0.a%)

I: haperonă (16, 0.9%)

citoschelet (2 (1, 1.2%) membrana **extracelulară (12, 0.7%)**

canal ionic (13, 0.4%)

transportor (44, 2.6%)

transportor intra cei ui ar

(51, 3%)

„Protooncogenă (23, 1.3%) proteină stri Kturală a muşchiului (8, 0.5%)

motor (13, 0.8%)

Fig. 2.1 *Clasificarea funcţională a genelor ortoloage în genomul vertebratelor şi nevertebratelor. Sunt indicate funcţia generică a produsului genei ortolog, echivalentă la om, Drosophila şi Caenorhabditis elegans, precum şi numărul genelor şi procentul comun alocat din genom acestor gene. Să notăm că factorii de transcripţie, dintre care au fost identificaţi 81 de ortologici la cele trei specii, reprezintă 4.7% din genom.* (Modificat după Venter & colab., 2001)

În acest capitol vom încerca să explicăm morfogeneza şi regionalizarea timpurie a sistemului nervos şi modul cum aceasta poate fi abordată comparativ la diferite specii. Dezvoltarea embrionară a sistemului nervos ne oferă şi oportunitatea de a invoca şi lecţiile

genomicii moderne, în particular, cercetările

care arată conservarea unor clase importante de gene de la insecte până la cele mai evoluate mamifere. Evoluţia structurilor nervoase nu s-a bazat pe diversificarea genelor, ci, de cele mai multe ori, pe duplicarea acestora. Înţelegem astfel că evoluţia genomului înseamnă mai degrabă creşterea redundanţei mecanismului de control genetic decât inventarea unor noi gene: mai multe copii ale unei gene înseamnă posibilitatea mai multor combinaţii specifice care să permită evoluţia morfogenezei. Cu alte cuvinte, de ce să inventezi o genă nouă când poţi să generezi mai simplu diversitate prin creşterea numărului de combinaţii? Aşa se explică de ce se pot stabili echivalenţe între gene care controlează morfogeneza unui sistem nervos relativ simplu, ca cel al *Drosophilei* şi a unui creier atât de complex ca al omului.

Mult timp s-a crezut că varietatea organizării structurilor nervoase la diferite specii poate fi atribuită diferenţelor genomice. În acord cu această presupunere, una din tezele neuroanatomiei clasice este că creierul insectelor şi al vertebratelor au evoluat separat. Genetica moleculară a indicat însă că specii „îndepărtate" cum ar fi musculiţa *Drosophila melanogaster* şi omul împart numeroase secvenţe genomice relevante pentru morfogeneza (Fig. 2.1). Înainte de secvenţierea genomului diferitelor specii, au existat embriologi cum ar fi K.E. von Baer (1828; pentru o sinteză, vezi: Northcutt, 2001) care au observat că între embrionii de la diverse vertebrate se pot stabili similarităţi morfologice. Aşa cum vom vedea, aplicarea destul de recentă a metodelor moleculare în neuroembriologie a completat şi, uneori, a amendat descrierea dezvoltării sistemului nervos strict pe principii morfologice. Identificarea unor mecanisme moleculare comune, implicate în morfogeneza sistemului nervos la diferite specii, a adus şi generalitatea abordării comparative. Programul de cercetare rezultat s-ar putea numi biologia evoluţionistă a dezvoltării şi îşi propune să studieze identitatea şi controlul molecular al formării sistemului nervos la diferite specii (Arthur, 2002; feeme, Nakamura & Osumi, 2001).

Modelele experimentale cel mai frecvent folosite în neuroembriologia modernă sunt musculiţa *Drosophila melanogaster,* peştele zebră *(Danio reno),* unii amfibieni cum ar fi *Xenopus laevia,* şi rozătoare ca şoarecele şi şobolanul, alături de modelul experimental

clasic al embrionului de găină. Cercetări efectuate la aceste modele experimentale au indicat că dezvoltarea axială şi, în particular, morfogeneza timpurie a sistemului nervos sunt controlate de cascade moleculare comune atât anamniotelor (peşti, amfibieni), cât şi amniotelor (reptile, păsări, mamifere).

Aceste cascade moleculare cuprind mai ales factori de transcripţie şi molecule de semnalizare. Factorii de transcripţie sunt proteine intracelulare care se pot lega de molecula de ADN, controlând astfel transcripţia genelor. Dintre factorii de transcripţie, cele mai cunoscute clase de gene sunt *Hox, Pax* şi genele *interval cefalic.* Genele Hox, descrise mai întâi la *Drosophila,* sunt numite astfel pentru că mutaţii ale acestor gene determină modificări homeotice, adică transformarea unui segment de corp în altul (vezi: Caseta 2. A, dar şi Ronshaugen, McGinnis & McGinnis, 2002). Majoritatea factorilor de transcripţie sunt numiţi după domeniul

cu care proteina se leagă de ADN astfel că, de pildă, secvenţa care codează domeniul cu care proteinele HOX se cuplează de ADN se numeşte homeocasetă *(homeobox).* După forma domeniului de cuplare de ADN al proteinei, alţi factori de transcripţie sunt numiţi *Pax,* indicator pentru casetă împerecheată *(paired box),* deget de zinc, helix înaripat (engl. *winged helix)* ş.a.

Protorax Mezotorax Metatorax

Fig. 2.2 *Relaţiile dintre segmentele embrionare, delimitate de teritoriul de expresie al unor gene, la larva şi la individul adult de Drosophila.* Segmente toracice (ST): T1-T3. Segmente abdominale (SA): A1-A8. (Modificat după Purves & colab., 2001 şi Lewis, 1995)

Moleculele de semnalizare sunt o altă categorie de molecule secretate sau proteine membranare care mediază semnale extracelulare. Pentru a recepta un astfel de semnal şi pentru a declanşa un răspuns intracelular – o celulă trebuie să aibă receptorii corespunzători. De pildă, un exemplu pe care îl vom analiza în acest capitol este molecula SHH secretată de mezoderm, al cărui receptor este codat de gena *pte* (engl. *patched,* peticit). Familiile majore de molecule secretate sunt HH (engl. *hedgehog,* arici), WNT (engl. *wingless,* fără aripi) şi factori de creştere cum ar fi factorul de creştere fâbroblastic 8 (FGF8) şi factorii de creştete transformatori-/fi (TGF-yff).

Cascadele de semnalizare în care sunt implicate aceste molecule au funcţii foarte variate. De pildă, un factor de transcripţie poate iniţia expresia unui receptor membranar de către o celulă permiţându-i acesteia să răspundă la anumite molecule de semnalizare secretate în alte regiuni. Pe baza acestui principiu, s-au descris diverse mecanisme moleculare care controlează diferenţierea celulară, respectiv, procese morfogenetice cum ar fi gastrulaţia şi inducţia neurală. Astfel, în funcţie de expresia unor factori de transcripţie şi molecule de semnalizare se poate stabili identitatea unei anumite structuri la nivelul tubului neural, înainte ca aceasta să poată fi discriminată morfologic. Domeniile de expresie ale acestor molecule pot fi

Caseta 2.A

***HOX, PAXŞI INTERVAL CEFALIC:* FACTORI DE TRANSCRIPŢIE CARE CONTROLEAZĂ MORFOGENEZA SISTEMULUI NERVOS**

Indicii că expresia anumitor gene stă la baza formării şi regionalizării tubului neural au fost oferite pentru prima dată de cercetările care abordau embriogeneza la *Drosophila.* Ca model experimental, *Drosophila* prezintă numeroase avantaje legate de mărimea redusă a indivizilor, uşurinţa cu care pot fi menţinute coloniile, fecunditate mare, ciclu de viaţă destul de scurt, număr mic de cromozomi şi prezenţa cromozomilor giganţi ai glandei salivare, numărul mare de mutaţii spontane şi uşurinţa inducerii unor mutaţii şi, nu în ultimul rând, existenţa unor linii sălbatice *(wild-type)* sau aşa-numitele linii standard.

Primele studii care au susţinut că transcripţia diferenţiată spaţial şi temporal a unor gene este mecanismul care controlează morfogeneza au fost reprezentate de înregistrările mutaţiilor careafectează morfogeneza. E. Wieschaus şi C. Niisslein-Volhard au efectuat o monitorizare a mutagenezelor embrionare, cunoscută astăzi ca screeningul Heidelberg. Monitorizările genetice se bazează pe provocarea unor mutaţii spontane prin imbredare şi descrierea fenotipurilor mutante. Aceste mutaţii trebuie să fie suficient de multe pentru a afecta cel puţin de câteva ori o genă. Din 1970, echipele celor doi cercetători descriu peste 580 de mutaţii din care doar 2, 5% s-a observat că sunt asociate cu alterări morfologice (Niisslein-Volhard & Wieschaus, 1980). Pe lângă durata foarte mare, această tehnică

complicată a fost criticată pentru că elimină genele materne prin faptul că indivizii homozigoţi sunt obţinuţi de la mame care prezintă o alelă normală a genei ţintă (pentru o sinteză, vezi: Wieschaus, 1995). Monitorizarea mutagenezelor a fost, însă, o tehnică utilă înainte de dezvoltarea secvenţierii şi donării genelor prin metode moleculare. Concluziile lui Wieschaus şi Niisslein-Volhard indică faptul că există gene reglatoare *(master control genes)* care controlează o cascadă de semnale ce determină regionalizarea sau segmentarea embrionului.

Începând din anii '60, E. Lewis descrisese unele mutaţii care erau asociate fie cu duplicarea unui segment corporal la *Drosophila,* fie cu dezvoltarea unui segment într-o zonă ectopică. La aproximativ 20 de ore de la fertilizare, *Drosophila* prezintă un aspect segmentar, succedându-se, de la anterior spre posterior mai multe regiuni sau segmente: cap (H), protorax (Ti), mezotorax (T2), metatorax (T3) şi segmentele abdominale (ArA8) (Fig. 2.2). Şi sistemul nervos, compus din ganglionii supraesofagian şi subesofagian prezintă segmente numite neuromere. Primul ganglion este împărţit în neuromerul protocerebral (El; segmentul anterior faţă de antenă), deutocerebral (B2; segmentul antenei) şi tritocerebral (B3; segmentul intercalar). Ganglionul subesofagian este compus din neuromerul mandibular (ŞI), maxilar (S2) şi labial (S3). O mutaţie care afectează acest proiect morfogenetic a fost izolată de C. B.

31

Bridges în 1915: alela numită *bx* determină transformarea metatoraxului în mezotorax, făcând ca structuri ca halterele să capete aspect de aripă (Fig. 2.3; Bridges, 1936). Bridges şi, mai târziu, E.B. Lewis propun termenul de homeoză (gr. *homeo,* asemănător) pentru acest fenomen, respectiv, de homeotic, pentru genele a căror mutaţie determină transformarea unui segment de corp în altul (Lewis, 1994, 1995).

Genele homeotice conţin q secvenţă nucleotidică numită homeocasetă *(homeobox)* care codează circa 60 de aminoacizi ce reprezintă homeodomeniul cu care factorul de transcripţie se leagă de ADN. Aceşti factori de transcripţie asigură controlul spaţial şi temporal al morfogenezei. La *Drosophila,* genele homeotice sunt grupate pe cromozom în complexe homeotice (HOM-C): *antenapedia* şi *bitorax.* Ceea ce surprinde şi este un exemplu de eleganţă şi simplitate a controlului molecular al embriogenezei este că genele homeotice sunt

aranjate pe cromozom de la capătul 3 spre capătul 5, corespunzător expresiei lor de-a lungul axei antero-posterioare. Altfel spus, genele dinspre capătul 3 controlează morfogeneza segmentelor anterioare ale trunchiului, iar cele dinspre capătul 5 controlează morfogeneza segmentelor mai posterioare (Hirth, Hartmann & Reichert, 1998). Această regularitate a fost numită coainearitate spaţio-temporală. Tot în cazul clasei HOX, a fost demonstrată *supresia fenotipică,* adică predominanţa genelor care controlează segmente mai posterioare asupra celor cu expresie spre anterior (Duboule & Morata, 1994). La mamifere, echivalentul genelor *HOM-C*

este grupul de gene *Hox* compus din patru complexe de gene echivalente (paraloage). Primele patru grupuri paraloage sunt, de pildă, exprimate în rombencefal. Generalitatea coainearităţii spaţiale se verifică prin echivalenţa observată între teritoriul de expresie al genelor *Hox* în rombencefal şi măduva spinării la vertebrate şi expresia genelor homeotice din sistemul nervos al *Drosophilei* (pentru alte exemple, vezi: Glover, 2001; Kammermeier & Reichert, 2001).

Un alt grup de gene implicat în controlul morfogenezei este cel ai genelor *intervalului cefalic (cephalic gap genes).* Denumirea le vine de la faptul că, în fazele timpurii ale embriogenezei, expresia acestor gene delimitează benzi întinse în segmentele anterioare, pentru ca, mai târziu, expresia lor să se restrângă în regiunea neurogenică procefalică ce va forma ganglionul supraesofagian de la *Drosophila* (Cohen & Jürgens, 1990, 1991). Genele despre care astăzi ştim cel mai mult sunt *otd (Drosophila},* având ca echivalent (ortolog) la mamifere genele *Otx-l* şi *Otx-2* şi genele *ems,* respectiv, la mamifere, genele *Emx-l* şi *Emx-2* (Simeone & colab., 1992). De notat este că identitatea funcţională a acestor ortologi a fost verificată în experimente în care gena *otd* a salvat fenotipul homozigot *Otx-l **1*** care nu prezintă partea rostrală a sistemului nervos (vezi: mai jos).

Alte gene implicate în morfogeneza sistemului nervos sunt un grup de gene numite generic gene cu casetă pereche *(Pax).* Aceste gene au fost identificate iniţial chiar în cadrul grupei *Hox,* dar ele prezintă un domeniu specific de cuplare de ADN de

128 de aminoacizi. La *Drosophila* au fost identificate şapte factori de transcripţie *Pax,* iar la rozătoare şi om au fost izolate nouă. *Pax-6,* de pildă, este implicat în morfogeneza ochiului, mutaţiile sale

generând un fenotip care la Drosophila se numeşte fără ochi *(eyeless)*, la şoarece este numit ochi mic sau hipotrofic *(small eye)*, iar la om cauzează aniridia (nu se produce morfogeneza irisului; pentru o sinteză, vezi: Strachan & Read, 1994)...

O problemă interesantă este cum aceste clase de gene controlează funcţii atât de diverse, cum stabilesc ele identitatea fiecărui segment al tubului neural? Ele au toate acelaşi motiv cu care se leagă de secvenţe specifice de ADN. De ce această redundanţă a recunoaşterii nu generează şi o redundanţă a funcţiilor pe care le controlează? Date recente arată că proteinele cu domeniu pereche pot interacţiona cu proteinele cu homeodomeniu şi că diferite astfel de interacţiuni generează recunoaşterea unor secvenţe diverse de ADN. Mai mult, proteinele cu domeniu pereche au, aşa cum indică şi numele, două subdomenii (numite PAI şi RED) care fiecare are potenţialul de a se cupla de secvenţe specifice de ADN. Şi aceste subdomenii pot interacţiona pentru a recunoaşte secvenţe diverse de ADN, chiar şi când nu sunt în aceeaşi moleculă (Xu & colab, 1995; Jun & Desplan, 1996).

Despre rolul celor mai studiate dintre aceste gene vom vorbi în detaliu în acest capitol. Pentru cei mai nerăbdători, este interesant să notăm că mutaţiile sau deleţia unor gene ca *Otx-l*, *Pax-3* sau *Pax-6* sunt asociate cu defecte de morfogeneza a urechii interne, aniridie, retardare mintală uşoară, sindromul Wardenburg caracterizat de deformări craniofaciale, spina bifida, cefalopolisindactilia Grieg (pentru detalii, vezi: Engelkamp & van Heyningen, 1996).

Referinţe bibliografice:

Bridges, C.B. (1936) *The bar gene: a duplication.* Science 83, 210 – 211

Cohen, S., Jürgens, G. (1990)

Mediation of Drosophila head development by gap-like segmentation genes. Nature 346, 482 – 485

Cohen, S., Jürgens, G. (1991)

Drosophila headlines. Trends Genet. 7.

267 – 271

Duboule, D., Morata, G. (1994)

Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. Trends Genet. 10, 358 – 364

Engelkamp, D., van Heyningen, V.

(1996) *Transcription factors în disease.*
Curr. Opin. Genet. Dev. 6, 334 – 342
Glover, J.C. (2001) *Correlated patterns of neuron differentiation and*
Hox gene expression in the hindbrain:
A comparative analysis. Brain Res.
Bull. 55, 683 – 693
Hirth, F., Hartmann, B., Reichert, H.
(1998) *Homeotic gene action in embryonic brain development of*
Drosophila. Development 125, 1579
1589
Jun, S., Desplan, C. (1996) *Cooperative interactions between paired domain and homeodomain.* Development 122.
2639 – 2650
Kammermeier, L., Reichert, H. (2001)
Common developmental genetic mechanisms for patterning invertebrate and vertebrate brains. Brain Res. Bull.
55, 675 – 682
33
Lewis, E.B. (1994) *Homeosis: the first 100 years.* Trends Genet. 10, 341 – 343 Lewis, E.B. (1995) *The bithorax complex: The first fifty years.* Physiol. Med. (Prelegere Nobel) Niisslein-Volhard, C, Wieschaus, E. (1980) *Mutations affecting segment number and polarity în Drosophila.* Nature 276, 565 – 570 Simeone, A., Acampora, D., Gulisano, M., Stornaiuolo, A., Boncinelli, E. (1992) *Nested expression domains of four homeobox genes în developing rostral brain.* Nature 358, 687 – 690

folosite drept markeri moleculari ai unor ţesuturi. În plus, ele ne indică interacţiunea dintre ţesuturile embrionare, ceea ce nu ne poate oferi abordarea morfologică clasică. Descrierea morfologică a embriogenezei poate fi limitată, fapt demonstrat, aşa cum vom vedea, mai ales în cazul prozencefalului. În acest context, este de neînţeles inerţia unor manuale de embriologie de a descrie embrionul ca o colecţie de straturi ce prezintă deformări morfologice specifice unor etape de dezvoltare.

Neuroembriologia moleculară a arătat că gastrulaţia, adică procesul prin care iau naştere ţesuturile embrionare primare (ectoderm, mezoderm, endoderm), este controlată de semnale de la nivelul unei zone numită organizator primar, care declanşează cascade

de semnalizare ce stabilesc identitatea neurală. Dezvoltarea ţesuturilor rezultate nu este condusă de forţe mecanice, inducţia neurală fiind controlată de semnale moleculare de ia mezoderm, endoderm şi ectodermul non-neural. Mai târziu are loc regionalizarea plăcii neurale şi, apoi, a tubului neural.

Fig. 2.3 *Transformări homeotice asociate mutaţiei bx la Drosophila. În jumătatea din dreapta, porţiune dintr-un exemplar normal (linie sălbatică); în jumătatea din stânga, un exemplar de homozigot bx la care segmentul T3, unde ar trebui să se formeze halterele, s-a transformat în T2, formându-se o aripă ectopică.* (Adaptat după E.B. Lewis, studiu nepublicat) /; /...

adică stabilirea identităţii unei structuri pe axa ciorsal-ventrală, respectiv, antero

posterioară. Acest proces de regionalizare este mediat de semnale de la organizatori secundari şi de la ţesuturi adiacente plăcii, respectiv, tubului neural. Astfel, celulele de la diferite niveluri ale tubului neural exprimă coduri moleculare specifice care delimitează zone longitudinale şi zone transversale, acestea din urmă fiind numite generic neuromere (Puelles & Rubenstein, 1993; Puelles, 1995; Rubenstein & colab., 1998). Să reţinem, deocamdată, că sistemul nervos se dezvoltă dintr-un strat de neuroectoderm care ia naştere din ectoderm printr-un proces numit inducţie neurală; acest strat îşi apropie părţile laterale şi se închide prin neuralaţie. Ceea ce indică neuroembriologia molecualră este că acest tub, în care celulele neuroepiteliale sunt, iniţial, nespecifice, se dezvoltă după domenii longitudinale şi transversale delimitate de teritoriile expresiilor unor gene. Pe acest schelet conceptual, în acest capitol vom articula probele experimentale.

Embriologia clasică a fost până nu demult dominată de paradigma columnară. Conform acestei concepţii, placa neurală, adică primordiul embrionar al sistemului nervos, este organizată în jumătăţi simetrice după o regiune mediană care va forma apoi partea cea mai ventrală a tubului neural (von Kupffer, 1906; Kuhlenbeck, 1973). Deci regionalizarea sau organizarea diferitelor structuri nervoase s-ar face numai după un proiect longitudinal (Altman & Bayer, 1995). Paradigma neuromerică recunoaşte, însă, atât existenţa unei

organizări longitudinale a plăcii neurale, cât şi a unor segmente transversale (neuromere), ambele tipuri de diviziuni fiind definite de expresia unqr gene cu rol în morfogeneză (Shimamura & colab., 1 – 9*95; pentru. O sinteză, vezi: Puelles, 1995, 2001). Neuromerele sunt semnificative... funcţional pentru că ele delimitează graniţele de expansiune clonală. Aceasta înseamnă că fiecare; primordiu, adică o celulă individuală sau un grup de celule din tubul neural, va da naştere la o structură derivată sau clonală, în care topologia părţilor se păstrează (Figdor & Stern, 1993; Fishell, Mason & Hatten, 1993; Fraser, Keynes & Lumsden, 1990). Faptul acesta este foarte evident la insecte, la care fiecare progenitor neuronal din ganglionul unui segment axial poate fi identificat prin poziţie şi prin expresia unor gene şi formează un subset distinct de neuroni (vezi: Caseta 2. A; Doe & Technau, 1993; Schmid, Chiba & Doe, 1999).

Neuromerele sunt marcate de expresia specifică a unor gene şi constituie câmpuri de creştere din care se vor dezvolta diferenţiat structurile nervoase. Activarea expresiei unor factori de transcripţie demarchează şi domeniul unor molecule secretate care participă la specificarea diferitelor porţiuni din tubul neural. Ele marchează limita dintre teritoriile prospective ale regiunilor nervoase majore: prozencefal *(forebrain),* mezencefal *(mesencephalon)* şi rombencefal (*rhombencephalori).* Pe măsura dezvoltării tubului neural, alte domenii transversale numite neuromere subdivid şi aceste vezicule; în rombencefal, constricţiile sunt mai evidente anatomic şi se numesc rombomere (Lumsden & Krumlauf, 1996), iar în prozencefal, acestea se numesc prozomere (Puelles & Rubenstein, 1993; Rubenstein & colab, 1994).

2.1 Organizarea axială şi inducţia neurală. Neurulaţia < «; **3**

— Primordiul sistemului nervos este o porţiune de neuroepiteliu pseudostratificat care a rezultat în urma gastrulaţiei dintr-un ţesut precursor numit ectoderm care ia naştere din epiblast. Gastrulaţia este procesul prin care se formează cele trei straturi germinative embrionare: ectodermul, din care se va forma şi neuroectodermul, mezodermul şi endodermul. Tratarea detaliată a gastrulaţiei depăşeşte spaţiul şi scopul unui capitol despre dezvoltarea sistemului nervos (pentru o prezentare schematică, vezi: Caseta 2. B şi referinţele, dar şi: Downs & Davies, 1993). Noi ne propunem să

detaliem numai acele aspecte ale gastrulaţiei care ne pot instrui pentru prezentarea inducţiei neurale, deşi, în unele cazuri, nu am putut trece fără să descriem unele experimente care constituie lecţii de biologie experimentală (pentru o prezentare complementară, vezi: Papilian & Preda, 1946, pp. 84 – 94). = → «– Citofrofoblast $5 Sinritiotrofoblast *" – < „– **vrw*%. *na i (v.***

Lacune trafoblastn

Cavitate exocelomică

µm

N

Membrana exocelomică

(Heuser)

Fig. 2*4 *Schemă a blastocistului uman la 9 zile după fecundaţie (*Modificat după Lagman, 1990 şi Olteanu & Lupu, 2000)

Stratul de neuroectoderm apare printr-un proces numit inducţie neurală. Inducţia neurală înseamnă, în principal, apariţia unei populaţii de precursori neurali dintr-o porţiune de ectoderm. La începutul secolului, Hans Spemann este primul care demonstrează că gastrulaţia şi inducţia neurală depind de semnale transmise de o porţiune posterioară de epiblast numită şanţ primitiv *(primitive streak)* şi, respectiv, de formaţiunile mezodermale care derivă din invaginarea epiblastului la nivelul şanţului primitiv. În capătul acestei zone de invaginare se găseşte o formaţiune embrionară cu proprietăţi organizatorice numită la mamifere nod. Dat fiind că nodul este cel care controlează gastrulaţia, el a fost numit organizator primar. Organizatorul primar controlează mai ales direcţia mişcării celulelor

Caseta 2.B

FAZELE GASTRULAŢIEI ŞI INDUCŢIEI NEURALE: DESCRIERE MORFOLOGICĂ

După fecundaţie, prin diviziuni multiple, zigotul se dezvoltă sub forma unei aglomerări de blastomere (celule-fiice), care, la aproximativ 3 O de ore de la fecundaţie, capătă aspectul unei mure şi se numeşte morulă. Embrionul ajunge apoi în stadiul de blastocist, fiind format dintre – parte unistratificată externă, numită trofoblast şi o masă celulară internă sau embrioblast. La embrionul uman, această fază se întâmplă între sfârşitul primei săptămâni şi cea de-a doua săptămână de dezvoltare embrionară. În această etapă, apar primele

anexe embrionare, sacul vitei în primar şi vezicula amniotica, iar trofoblastul se diferenţiază la polul de implantare (embrionar) în sincitiotrofoblast, aflat spre mucoasa uterină şi citotrofoblast. Celulele sincitiotrofoblastului vor eroda mucoasa uterină care răspunde prin dilatarea capilarelor sinusoide şi îmbogăţirea cu mucus şi glicogen prin intermediul glandelor stromei uterine. Prin erodarea peretelui endotelial al capilarelor materne, se va putea stabili circulaţia materno-fetală la nivelul sistemului lacunar sincitiotrofoblastic.

În această perioadă, din embrioblast se diferenţiază un strat de celule înalte numit epiblast *(ectophylium)* şi, spre cavitatea blastocistului, un strat de celule mai mici numit hipoblast sau *endophyllum* (la embrionul uman, la 8 zile după fecundaţie; Fig. 2.4). Între epiblastul de-abia diferenţiat şi citotrofoblast apare cavitatea amniotica, delimitată spre citotrofoblast de un strat de celule aplatizate numite amnioblaşti. Cele două straturi-precursor, epiblastul şi hipoblastul, formează discul embrionar. Din hipoblast derivă celule aplatizate care vor forma membrana Heuser ce delimitează cavitatea exocelomică (sacul vitelin primar; embrionul uman: 9 zile după fecundaţie). Mai târziu (13 zile după fecundaţie), celulele hipoblastului vor prolifera, vor migra pe faţa internă a membranei Heuser şi va apărea astfel o nouă cavitate în interiorul cavităţii exocelomice, numită sac vitelin definitiv. Între faţa internă a citotrofoblastului şi faţa externă a cavităţii exocelomice va apărea o populaţie de celule mezenchimatoase cu aspect reticular care vor forma mezodermul extraembrionar (11 – 12 zile după fecundaţie). Mezodermul care acoperă cavitatea amniotica se numeşte mezoderm somatopleural, iar cel care acoperă sacul vitelin este denumit mezoderm splanhnopleural. În mezodermul extraembrionar vor apărea cavităţi care, în final, vor conflua formând cavitatea corionică (13 zile după fecundaţie).

Recapitulând, la sfârşitul celei de-a doua săptămâni, discul embrionar este format din două discuri adiacente: epiblastul, primordiul ectodermului, în partea bazală a cavităţii amniotice şi hipoblastul, primordiul endodermului, care reprezintă partea superioară a sacului vitelin definitiv (pentru detalii, vezi: Sadler, 1990, pp. 39 – 46; de asemenea, Bareliuc & Neagu, 1977, pp. 30 – 34; Enders, Schlafke & Hendrickx. 1986)

37

În cazul embrionului uman, la începutul săptămânii a 3-a (16

zile după fecundaţie), celulele epiblastului din regiunea caudală vor migra spre linia mediană formând şanţul primitiv care prezintă în partea anterioară o formaţiune numită nod. Acesta este începutul gastrulaţiei (Fig. 2.5). În zona şanţului primitiv, celulele care au migrat din epiblast sunt invaginate şi vor forma ectodermul embrionar, prin deplasarea hipoblastului, acum, endoderm, iar celulele aflate imediat sub ectoderm vor forma mezodermul embrionar. Derivatele mezodermice primare ale nodului vor fi împinse anterior pe linia mediană şi vor forma placa precordală, continuate posterior de procesul cefalic *(head process)*, respectiv, norocord. Din epiblastul aflat deasupra plăcii precordale şi norocordului va lua naştere, prin inducţie neurală, placa neurală, primordiul sistemului nervos. Aceasta va suferi procesul de neurulaţie prin care capetele sale laterale se vor apropia, închizând placa neurală sub forma tubului neural.

După neurulaţie, tubul neura prezintă patru domenii longitudinale primare: în partea dorsală, formată prin unirea părţilor laterale ale plăcii neurale, se observă placa tavanului; î™ partea ventrală, se formează placa podelei, din zona mediană a plăcii neurale. Părţile laterale ale tubului neural sunt împărţite într-o placa bazală, adiacentă plăcii podelei, şi o placă afară, între placa bazală şi placa tavanului. Neurulaţia presupune şi închiderea neuroporilor, adică extremităţilor anterioară şi posterioară ale tubului neural.

Referinţe bibliografice:
Bareliuc, L., Neagu, N. (1977)
Embriologie umană. Ed. Medicală
Bucureşti
Enders, A. C, Schlafke, S., Hendrickx.
A. (1986) *Differentiation of the embryonic disc, amnion andyolk sac in the Rhessus monkey.* Am. J. Anat., 177
161 – 185
Sadler, T.W. (1990) *Langman's*
Medical embriology. Williams &
Wilkins, Baltimore epiblastului şi stabileşte astfel orientarea organizării axiale sau axa antero-posterioară (Spemann, 1938). Vom detalia aceste aspecte în continuare.

La începutul secolului trecut, o serie de experimente au încercat să determine dacă ţesuturile precursor, epiblastul şi hipoblastul, evoluează separat sau se influenţează reciproc. Primele experimente

care au investigat direct dacă formarea axei embrionare este dependentă de interacţiunea dintre epiblast şi hipoblast sunt cele ale lui C.H. Waddington. Waddington (1933) a separat hipoblastul de epiblast şi l-a rotit pe primul cu 90°, astfel încât axa sa antero-posterioară să fie perpendiculară pe cea a epiblastului. Rezultatele au indicat că şanţul primitiv se formează, dar este curbat în direcţia anterioară originară a endodermului. Concluzia a fost că hipoblastul determină direcţia de mişcare a celulelor din epiblast. Folosind mijloace chirurgicale şi de incubare moderne, Y. Azar şi H. Eyal-Giladi (1979, 1981) au reluat experimentele lui Waddington cu

Intenţia de a stabili o cronologie a influenţelor pe care le exercită hipoblastul asupra epiblastului (Fig. 2.6). Ei au demonstrat însă că rotirea cu 90° a hipoblastului determină dezvoltarea şanţului primitiv conform cu noua polaritate antero-posterioară, cu o deviaţie minimă de 10°-15° (Eyal-Giladi & Wolk, 1970; Azar & Eyal-Giladi, 1979, 1981). Rezultate ulterioare au indicat chiar că şanţul primitiv se dezvoltă în absenţa hipoblastului, dar că, dacă acesta este totuşi prezent, polaritatea determinată de hipoblast predomină (Mitrani & Eyal-Giladi, 1981; Mitrani, Shimoni & Eyal-Giladi, 1983). Mai recent, Khaner (1995) replică experimentele cu un control mult mai riguros al mărimii discului de hipoblast ce este decupat şi rotit. Khaner susţine că:

„Concluzia acestor rezultate este că nu există nicio dovadă că hipoblastul rotit ar induce o axă ectopică în epiblast în stadiul XIII. Fie hipoblastul nu exercită nicio influenţă inductivă asupra epiblastului în această etapă în situaţia experimentală, fie, dacă exercită vreo influenţă, epibâastul domină acest efect […]". (Khaner, 1995, pp. 10736)

Vom reveni asupra relaţiei dintre epiblast şi hipoblast după sfârşitul acestei incursiuni în embriologia clasică.

Placa neurală

Şanţ primitiv

Şanţ primitiv

Fig. 2.5 *Vederi dorsale ale embrionului uman la 16 (a), 18 (B), 19 (C) şi, respectiv, 20 de zile după fecundaţie (D). În detaliu (a), o secţiune transversală la nivelul indicat în A, pe care se observă cum celulele epiblastului (Epi) sunt invaginate la nivelul şanţului primitiv (ŞP).* Hipo,

hipoblast. (Modificat după Langman, 1990).

Alte cercetări de pionierat fuseseră efectuate de Wilhelm Roux şi Hans Driesch care au separat diferite părţi ale embrionului şi le-au cultivat apoi izolat (Roux, 1895). Aceste experimente voiau să arate dacă ţesuturile embrionare se pot autodiferenţia şi, dacă nu, de la ce stadiu dezvoltarea lor e dependentă de interacţiunea cu alte ţesuturi embrionare. Între cei doi cercetători exista o controversă pentru că Roux arătase că, dacă se distruge unul din cele două blastomere ale unui ou de broască, din blastomerul rămas se va obţine doar o parte din embrion. Driesch, în schimb, reuşise să obţină un embrion întreg, e adevărat, mai mic, dintr-un blastomer de mamifer marin separat tot în stadiul de două

blastomere. În anii '20—30, Hans Spemann a devenit cunoscut demonstrând că diferenţa depindea de metodă, astfel că, dacă celula distrusă nu era înlăturată, din blastomerul rămas se dezvoltau doar o parte din ţesuturile embrionare (Spemann, 1935). Spemann avea să efectueze o serie de experimente care au relevat aşa-numitul efect al organizatorului şi care au culminat în 1935 cu acordarea premiului Nobel pentru Fiziologie şi Medicină.

Poate unul din cele mai elegante experimente ale Spemann au constat în înlocuirea reciprocă prin transplantare a unui segment de epidermă cu unul izolat din placa neurală la începutul gastrulaţiei. Schimbul de grefe era efectuat între două specii apropiate de amfibieni *(Triton taeniatus* şi *T. cristatus),* la prima specie, pigmentarea celulară fiind mai accentuată, astfel că soarta grefei putea fi urmărită

A

Hipo Wast

Epiblast

Fig. 2.6 *Procedura experimentală prin care un disc de hipoblast este rotit cu 90° faţă de axa epiblastului.* A, anterior; P, posterior. (Modificat după Khaner, 1995)

uşor. Rezultatele au indicat că grefele s-au dezvoltat conform nişei în care au fost transplantate. Concluzia lui Spemann a fost că, în perioada gastrulaţiei timpurii, celulele sunt naive (nediferenţiate) şi, mai important, că dezvoltarea lor poate fi indusă de influenţe exercitate de mediul în care sunt transplantate (Spemann, 1935, 1938). În această direcţie, colaboratorii lui Spemann, Hilde şi Otto

Mangold arătaseră că o porţiune din epiblast din zona şanţului primitiv, denumit astăzi nod sau uiganixaiur pemann, aar şi placa preco rdală şi norocordul, pot induce formarea unei plăci neurale ectopice (Spemann & Mangold/ 1929) sau, transplantate într-o regiune naivă a altui embrion, pot induce formarea unei axe embrionare secundare (Mangold, 1924). Mangold afirmă că această capacitate inductivă se păstrează mult timp, dar că reactivitatea diferitelor ţesuturi embrionare la influenţa organizatorului este limitată temporal (Mangold, 1931).

Pornind de la observaţia lui O. Mangold că nodul poate induce formarea unei plăci neurale, Spemann urmăreşte această proprietate la derivatele mezodermice rezultate prin invaginarea la nivelul şanţului primitiv a epiblastului. Experimentele lui, foarte ingenioase, au inversat porţiunea de mezoderm care

derivă prima din şanţul primitiv şi se situează în final în partea cea mai rostrală a tubului neural, adică placa precordală, cu porţiunea cea mai caudală a mezodermului care se află sub măduva spinării prospectivă, adică norocordul (vezi: Fig. 2.25). Placa precordală plasată la nivelul trunchiului poate induce o structură asemănătoare creierului, în timp ce norocordul nu poate rescrie soarta neuroectodermului rostral, acesta dezvoltându-se normal în structuri nervoase rostrale. Tot Spemann arată că grefe izolate la începutul gastrulaţiei dintr-un organizator tânăr pot induce formarea unui tub neural complet, în timp ce noduri. izolate din perioade de dezvoltare mai târzii nu pot induce decât formarea unor structuri neurale mai posterioare. Concluzia iniţială era că nodul îşi pierde gradual proprietatea de a induce diferite părţi ale tubului neural, pentru ca, ulterior, Spemann să postuleze existenţa unor organizatori independenţi: unul cefalic *(head-orgemizer)*, respectiv, un organizator al trunchiului *(trunk-organizer)* (Spemann, 1935, 1938). Holtfreter (1936, 1938), ca şi Mangold, accentuează şi importanţa competenţei de neuralizare a ţesutului, o idee care, aşa cum vom vedea, a fost confirmată şi extinsă în embriologia modernă (pentru o sinteză, vezi: Toivonen, 1978). Waddington (1932) arată că, la embrionul de găină, dacă se plasează o grefă de nod în proximitatea plăcii neurale, se formează o a doua axă, ectopică, dar care împarte structurile cefalice cu axa locală.

Explicaţii alternative ale unor rezultate similare au propus existenţa a două gradiente: unul care neuralizează, factor derivat, probabil, din mezodermul axial, şi unul care conferă identitate posterioară neuroectodermului (pentru o prezentare detaliată, vezi: Saxen & Toivonen, 1962). După acest model numit modelul activării-transformării, susţinut mai ales de P. Niewkoop (Niewkoop & Nigtevecht, 1954), inducţia şi regionalizarea neuroectodermului antero-posterior reprezintă un proces în două etape: în prima etapă, semnale inductive activează ectodermul realizând inducţia neurală şi conferind ţesutului un caracter anterior, urmată de acţiunea unor semnale care caudalizează neuroectodermul după un gradient posterior-anterior (Niewkoop & colab, 1952).

Cercetările de embriologie tradiţională expuse, în parte, mai sus susţin că axa antero-posterioară apare în urma proceselor gastrulaţiei: apariţia şanţului primitiv, declanşarea influenţei organizatorului, invaginarea epiblastului şi apariţia mezodermului care, aşa cum vom vedea, asigură semnalele necesare finalizării organizării axiale a embrionului (pentru o sinteză recentă, vezi: Beddington & Smith, 1993). Efectul de organizator descris pentru organizatorul Spemann la amfibieni *(Xenopus laevia)* a fost demonstrat ulterior şi la peşti, la care organizatorul poartă numele de scut *(shield),* la embrionul de găină (nodul lui Hensen) şi la şoarece (nod). Dacă sunt transplantate ectopic, grefe de organizator Spemann sau din regiunea nodului Hensen, acestea pot induce o axă neurală I completă, însă experimente mai recente arată că transplantarea unor grefe din regiunea nodului de la şoarece poate induce o axă neurală lipsită de partea rostrală (Beddington, 1994; Tam & colab., 1997). Aceeaşi capacitate inductivă parţială este demonstrată şi de grefele de organizator izolate în stadii mai târzii ale gastrulaţiei sau chiar imediat după naştere (Waddington, 1932; Beddington, 1994). Aceste date

au ridicat problema dacă influenţa organizatorului este suficientă pentru induc completă a axei neurale, tendinţa mai recentă (de ex.: Foley, Skromne & Sten 2000) fiind de a favoriza modelul activării-transformării care se bazează tocmai «existenţa unor semnale multiple.

2.1.1 Mecanisme moleculare care contribuie la inducţia neurală

Se ştie astăzi că organizatorul primar asigura semnale care

iniţiază expresia unor gene care disting sistemul nervos de ţesuturile non-neurale. Primei observaţii asupra naturii acestor semnale derivate de la nivelul nodului au indica că efectul de organizator se păstrează chiar dacă fragmentul de ţesut care conţin nodul este triturat, fiert, îngheţat sau menţinut în alcool de concentraţie 96% tim de chiar 3 minute! Aceste observaţii derivate, aparent, dintr-o joacă experimental au dus la concluzia că semnalele responsabile de organizarea axială sunt de natura chimică. Mai mult, agenţi chimici comuni cum ar fi acidul oleic sintetic sau chiar fragmente de ţesut hepatic sau renal pot induce formarea unei plăci neurale ce să închide complet pentru a deveni tub neural (vezi: Holtfreter, 1933, 1934). Odată cil perfecţionarea tehnicilor moleculare, a devenit evident că identitatea celulară esta determinată de molecule de semnalizare care controlează expresia spaţio-temporala a unor grupe de gene, cu alte cuvinte, molecule care stabilesc intervalul şi teritoriul de expresie a unor gene.

Problema pe care am introdus-o este cum anume, mai precis, prin ce semnale mezodermul controlează inducţia neurală. În continuare, vom descrie o parte din moleculele secretate şi genele a căror expresie este identificată chiar din perioada gastrulaţiei timpurii şi care ne vor instrumenta revenirea la problema enunţată, după ce vom fi achiziţionat alfabetul molecular premergător inducţiei neurale.

Unele din primele molecule de semnalizare care sunt detectabile în zona şanţului primitiv sunt glicoproteinele codate de familia de gene *Wnt,* ortoloagele la mamifere ale genelor *fără aripi (wingless, Wg)* de la *Drosophila. Wnt-3 a* este exprimat în acele celule pluripotente ale epiblastului ce vor fi invaginate prin şanţul primitiv şi care vor da naştere la mezodermul paraxial reprezentat de segmentele de mezoderm care flanchează de la anterior spre posterior placa precordală şi norocordul, formaţiuni ale mezodermului axial (Takada & colab., 1994; pentru o sinteză, vezi: Wilson & Beddington, 1996). Această moleculă pare să fie implicată mai ales în morfogeneza somitelor, viitoarele vertebre; embrionilor care nu prezintă nicio copie a genei *Nnt-3 a* le lipsesc primele şapte până la nouă somite anterioare. Interesant, în locul mezodermului paraxial se formează neuroectoderm (Yoshikawa & colab., 1997).

Formarea mezodermului este dependentă de acţiunea unor factori de transcripţie care prezintă un domeniu de cuplare de ADN numit casetă T *(T-box).* Doi dintre aceşti factori de transcripţie, *T*

(numit şi brahiuri; *engl. brachyuri)* şi *Thx6* –, sunt exprimaţi, ca şi *Wnt-3 a,* în aceeaşi populaţie de celule ale epiblastului din care va deriva mezodermul paraxial. Mai mult, fenotipul asociat alelei nule

(nefuncţionale) a unuia din cei doi factori de transcripţie este caracterizat de lipsa morfogenezei mezodermului şi prezenţa unei plăci neurale eetopice, care formează un tub neural sub tubul neural endogen, la fel ca şi la homozigotul fără nicio copie a genei *Wnt-3 a,* notat *Wnt-3 a* (**Fig.** 2.7; Chapman & Papaioannou, 1998; pentru o sinteză, vezi: Smith, 1999). Experimente recente au explicat această similaritate prin faptul că factorul de transcripţie *T* este controlat de glicoproteina codată de gena *Wnt-3 a.* Controlul exercitat de glicoproteina asupra factorului de transcripţie este dependent de doză, întrucât severitatea mutaţiei, adică numărul somitelor care nu se formează, depinde direct de doza în care este secretată molecula (pentru detalii, vezi: Greco & colab., 1996). Deci, glicoproteina codată de *Wnt-3 a* controlează expresia factorului de transcripţie *T* (brahiuri) fără de care celulele epiblastului sunt invaginate prin şanţul primitiv, dar îşi păstrează caracterul epitelial transformându-se în neuroectoderm şi inducând formarea unui tub neural ectopic, situat ventral de tubul neural primar (Yamaguchi & colab, 1999).

Fig. 2.7 *Expresia unor gene specifice mezodermului paraxial (Mox 1), respectiv, tubului neural (Wnt-3 a) la embrioni de şoarece normal (wt; A, C) şi la embrioni homozigoţi pentru mutaţia genei factorului de transcripţie T (T/T; B, D). Wnt-3 a este exprimat într-un tub neural ectopic (săgeată) situat ventral de tubul nervos endogen care pare să fi înlocuit mezodermul a cărui morfogeneză a fost perturbată.* (Adaptat după Yamaguchi & colab., 1999, cu permisiunea autorilor)

Alţi factori de semnalizare care sunt detectaţi în perioada gastrulaţiei timpurii sunt membrii familiei de factori de creştere transformatori (TGF-/? *transforming growth factor):* activina, BMP-4 şi BMP-7 (proteine morfogenetice osoase; *bone morphogenetic proteins).* Aceşti trei factori de creştere descriu ceea ce putem numi un joc de antagonizare cu moleculele secretate folistatină *(follistatin),* noghină *(noggin)* şi cordină *(chordin).* Să descriem jocul acestui antagonism: *BMP-4* este exprimat la niveluri reduse aproape în tot embrionul, înainte de gastrulaţie, în timp ce *BMP-7* este exprimat mai ales în regiunile mai posterioare ale embrionului (Fig. 2.8). La apariţia

şanţului primitiv, expresia nici unuia din cei doi factori de creştere nu mai poate fi detectată, pentru ca, la începutul gastrulaţiei, *BMP-7* să fie exprimat în zona şanţului primitiv şi, apoi, în ţesutul non-neural care înconjoară placa neurală. În mod similar, *BMP-4* este exprimat în celulele care se confundă cu limita dintre neuroectoderm şi ectodermul

43

n non-neural (Streit & colab., 1998). Dacă este indusă expresia *BMP-4 m* celulele din care ar trebui să derive şanţul primitiv, organizatorul nu se mai formează; acest lucru este pus în evidenţă prin absenţa expresiei factorului de transcripţie *T*, care, aşa cum am văzut, este specifică şanţului primitiv. Mai mult, dacă expresia *BMP-4* este indusă în zona nodului în faze mai târzii ale gastrulaţiei, norocordul, som iţele şi placa neurală nu apar. Deci, formarea organizatorului presupune suprimarea expresiei *BMP* A.

BMP-7

Fig. 2.8 *Expresia BMP-4 şi BMP-7 la embrionul de găină normal. În stadiul 4 (a), respectiv, stadiul 5 (B), expresia BMP-4 este prezentă în aria clară, ca un inel în jurul zonei din care se va forma placa neurală, şi se întinde posterior până la şanţul primitiv (săgeată albă). (C) Expresia BMP-4 se intensifică la marginile plăcii neurale în dezvoltare în stadiile 7 – 8. În stadiul 4 (D), expresia BMP-7 se extinde din zona posterioară a şanţului primitiv şi înconjoară până la stadiul 5 (E) zona plăcii neurale prospective, cuprinzând şi placa precordală (săgeată neagră în E). În stadiul 8, expresia BMP-7 se concentrează la marginile plăcii neurale-şi este prezentă şi în porţiuni adiacente de ectoderm non-neural.* **(Adaptat după Streit & colab,** 1998, cu **permisiunea autorilor)**

Odată cu apariţia nodului şi inducţia neurală, unele celule încep să exprime genele care codează molecula de semnalizare folistatină, ce se leagă direct şi

44

Împiedică activina să interacţioneze cu receptorii specifici, precum şi cordina şi noghina care antagonizează BMP-4 (**Fig.** 2.9). Aceste celule sunt celulele organizatorului şi celulele mezodermului axial (Hemmati-Brinvalou, Kelly & Melton, 1994; Piccolo & colab., 1996; Zimmermann, De Jesus-Escobar & Harland, 1996). Acest antagonism a fost identificat şi între ortologii jă MP-4/cordină la

Drosophila, e vorba de factorul dpp şi, respectiv, produsul genei *sog* (acronim de la gastrulaţie scurtă; *short gastrulation;* pentru o sinteză, vezi: Holley & Ferguson, 1997). Datorită antagonismului cu BMP-4 (factor antineuralizator, care participă la specificarea mezordermului paraxial) şi exprimării lor chiar la începutul gastrulaţiei şi inducţiei neurale, s-a presupus că aceste molecule secretate sunt factori care neuralizează. Ipoteza s-a verificat pentru că, de pildă, cordina, dacă este exprimată în celulele din care va deriva forma nodul, poate induce formarea unui şanţ primitiv. Cordina nu este însă suficientă pentru inducţia neurală, dar este necesară pentru competenţa celulelor ectodermului de a deveni neuroectoderm (Streit & colab, 1998). Alte gene şi molecule de semnalizare trebuie să fie exprimate pentru ca din ectodermul nespecific să poată lua naştere neuroectodermul ce formează placa neurală (pentru o sinteză, vezi: De Robertis, 1995). Convergente cu această concluzie, modele recente (Piccolo & colab., 1999) sugerează că inducerea neuroectodermului depinde de supresia simultană a semnalelor mediate de WNT şi TGF-/? De pildă, proteina numită cerberus, secretată de endodermul anterior, poate să se lege atât de factorii BMP, cât şi de WNT, astfel că poate suprima concomitent sau, în interacţiune cu cordina, ambele semnale care par să antagonizeze neuralizarea ectodermului (vezi: Piccolo & colab., 1999).

A B

Fig. 2.9 *Expresia moleculei cordina la embrionul de găină normal. În stadiul XIII (după Eyal-Giladi & Kochav) (a), expresia cordinei poate fi detectată în zona posterioară, pentru ca până în stadiul 3 (după Hamburger & Hamilton) (B), expresia acesteia să se concentreze pe toată lungimea norocordului (indicat de paranteză) până la nodul lui Hensen (indicat de săgeată albă).* (Adaptat după Streit & colab, 1998, cu permisiunea autorilor)

Pentru a sincroniza acţiunea acestor molecule, vom abandona puţin simpla lor descriere, pentru a modela cu ajutorul mijloacelor moleculare problema lui Spemann care era preocupat de sursa semnalelor care controlează inducţia neurală. Să ne aducem aminte de experimentul în care Spemann a indicat că noduri izolate în faze târzii ale gastrulaţiei la amfibieni nu pot semnaliza decât inducţia părţilor

posterioare ale neuroectodermului. Deşi acest fapt a fost interpretat iniţial în direcţia pierderii capacităţii organizatoare a nodului odată cu evoluţia gastrulaţiei, Spemann a postulat ulterior existenţa a doi organizatori, unul pentru cap şi altul pentru trunchi (pentru detalii, vezi: Spemann, 1938). Numeroase replici ale acestor experimente (Gallera, 1971; Storey & colab., 1992; pentru o analiză detaliată, vezi: Nieuwkoop, Johnen & Albers, 1985) au confirmat rezultatele lui Spemann la embrionul de găină. Mai mult, P.P.L. Tam şi colaboratorii (1997) au transplantat noduri izolate la începutul gastrulaţiei la şoarece şi au arătat că, indiferent de vârsta nodului, spre deosebire de nodul de la amfibieni, acesta nu poate induce deloc neuroectodermul anterior. Prin urmare, aceste rezultate întăresc şi mai mult presupunerea existenţei unui organizator separat pentru neuroectodermul anterior.

Fig. 2.10 *Expresia Otx-2 în timpul gastrulaţiei la şoarece. În stadiul de presant (a), Otx-2 este exprimat în întregul endoderm visceral (VE) şi epiblast (Epi), Pe măsura dezvoltării şanţului primitiv (B), expresia Otx-2 este limitată la treimea anterioară a embrionului şi, în stadiile şanţ târziu/stadii cefalice (C), Otx-2 este exprimat anterior în toate cele trei straturi embrionare (NE A, neuroectoderm anterior; Mez A, mezoderm anterior; AVE rez, endoderm visceral anterior rezidual).* (Modificat după Simeone, 1998)

Rolul de organizator al capului a fost documentat în ultimul timp pentru un ţesut numit endorderm visceral anterior (AVE, *anterior visceral endoderm)* care se găseşte anterior faţă de porţiunea unde va apărea nodul (Fig. **2.10).** Epiblastul va începe să fie invaginat la nivelul nodului şi din aceste celule se va forma şi mezodermul axial, adică placa precordală anterior şi, posterior, norocordul, care vor împinge astfel AVE spre polul anterior. Deci, ca locaţie, AVE este apt de a

emite semnale prin care să controleze neuralizarea ecodermului anterior. S-a arătat că un factor de transcripţie specific AVE este *Hex,* a cărui expresie poate fi detectată în endodermul visceral cu cel puţin o jumătate de zi înainte de gastrulaţie. *Hex* este un factor de transcripţie cu homeocasetă, codat de gene homeotice *(Hox)* (Thomas, Brown & Beddington, 1998). Prin urmare, avem cel puţin un marker prin care putem vizualiza ce se întâmplă cu AVE în timpul gastrulaţiei. Analizând gradientul acestui factor de trăsnenpţie, s-a arătat că AVE posedă o

polaritate antero-posterioară înainte de apariţia şanţului primitiv. Am putea spune: convenabil! Dar, mai mult, ablaţia AVE duce la dezvoltarea unor embrioni cărora le lipsesc structurile cefalice, inclusiv derivatele neuroectodermului rostral (pentru detalii, vezi: Thomas & Beddington, 1996). S-a mai arătat recent că în celulele AVE poate fi detectată şi expresia genei care codează o proteină pe care am amintit-o anterior, e vorba de cerberus, care, prin supresia multipotenţială a factorilor anti-neuralizatori, WNT şi BMP, contribuie la inducţia neuroectodermului anterior (Belo & colab., 1997; Shawlot, Deng & Behringer, 1998). Foarte interesant, *Hex* reprimă expresia cordinei (Brickman & colab., 2000).

Dacă rezumăm ceea ce ştim, toate aceste date indică faptul că există un organizator special pentru cap (neuroectoderm anterior), respectiv, unul pentru trunchi (neuroectoderm posterior), aşa cum indicase Spemann. De ce? Cordina şi noghina sunt exprimate în mezodermul axial (Sasai & colab., 1994, respectiv, Smith & colab., 1993). *Hex* şi cerberus sunt exprimate în endodermul visceral anterior. Toate cele patru molecule contribuie la inducţia neurală prin antagonismul cu WNT şi BMP. Dar, *Hex* antagonizează şi cordina, deci, *Hex* menţine identitatea AVE şi specificitatea inducţiei neurale: AVE controlează inducţia neuroectodermului anterior, iar mezendodermul axial controlează inducţia neuroectodermului posterior (pentru comentarii, vezi: Brickman & colab., 2000, dar şi: Foley, Skromne & Stern, 2000).

Alte dovezi pentru rolul AVE ca organizator al capului, sau, în general, ca represor al semnalelor neuralizatoare posterioare (de ex., cordina), au venit din studiul funcţiei altor factori de creştere din familia TGF-/? numiţi generic nodal. Nodal este exprimat mai întâi în întreg ectodermul primar, pentru ca expresia sa să fie apoi restrânsă în zona în care va apărea şanţul primitiv şi, interesant, în endodermul visceral anterior. Aceasta ar indica faptul că aceşti factori de creştere au rol în inducţia neuroectodermului anterior. Experimentele au confirmat această presupunere: dacă factorii nodal nu sunt exprimaţi în AVE, embrionii nu prezintă structurile nervoase anterioare (Varlet, Collignon & Robertson, 1997).

Observăm că neuroembriologia moleculară a identificat mecanimele puse în evidenţă de experimente din embriologia clasică. Nu ne propunem să descriem toţi markerii moleculari ai

mezodermului sau să prezentăm exhaustiv interacţiunile moleculare care controlează inducţia neurală. Literatura recentă pe această temă, foarte substanţială şi spaţiul limitat pe care ni-l impunem pentru acest capitol, ne obligă să ignorăm, aşa cum am avertizat de la început, numeroase aspecte (pentru o prezentare schematică şi a altor markeri moleculari care contribuie la inducţia neurală, vezi: **Tabelul 2.1,** dar şi Kiecker & Niehrs, 2001). Totodată, avertizăm că

am subscris la anumite seturi de date şi concluzii favorizate, de altfel, de majoritatea autorilor din domeniu, dar că ne-am şi ferit astfel de prezentarea unor controverse (de pildă, pentru alte rezultate privind rolul factorilor Nodal, vezi: Thisse, Wright & Thisse, 2000 şi referinţele). Capacitatea AVE de a semnaliza singur inducţia neurală amterioară este încă discutată, mai ales în lumina unor rezultate recente, care au indicat că porţiuni din endodermul visceral anterior de la şoarece grefate într-o regiune laterală faţă de axa embrionară a embrionilor de găină nu pot induce ţesut neural decât în conjuncţie cu semnale derivate de la organizator şi epiblastul anterior (Tam, 1999).

Tabelul 2.1

Gene implicate în gastrulaţie şi inducţia neurală

Gena	Funcţia	Referinţe
Factori de transcripţie *gsc*	Represor (specificarea plăcii precordale)	Ferreiro colab., 1998; Latinkik Smith, 1999
Otx2	Activator (inducţia neurală anterioară şi specificarea formaţiunilor nervoase rostrale)	Simeone colab, 1993
Lirul	Specificare anterioară	Barnes colab., 1994; Taira,

		Saint-Jeannet & Dawid, 199
HNF3 fi	Formarea mezodermului. specificare anterioară	Ang & c 1993
Hex	Specificare anterioară	Brickman colab. 2000; Zara & colab. 1995
Molecule *BMP-4, 7* secretate	Formarea organizatorului. Represor (antagonist al neuralizării)	Streit & c 1998; Dale & c 1992 1997
Cerberus	Antagonist Wnt şi TGFP	Piccolo colab, 1999
noghin	Represor al BMP	Smith Harland, 1992
cordină	Represor al BMP	Bachiller colab, 2000
folistatină	Represor al BMP (activină)	Hemmati-N valou. Kelly Melton, 1994
Nodal	Specificarea mezodermului ventral. Activator (şi represor?)	Varlet, Collignon & Robertson 1997; Thisse Wright Thisse, 2000 *
antivină	Represor al	Thisse

	Nodal		Thisse, 1999
Shh		Specificarea neuroectodermului ventral	Dale & colab., 1997

— Studiu care oferă rezultate diferite faţă de corpal reprezentat de alte cercetări.

48

În continuare, vom descrie rolul altui factor de transcripţie, numit *Otx-2* care, împreună cu *Otx-l,* sunt ortologi a-i factorilor *oţel* din familia genelor de tip *interval ce/alte* de la *Drosophila* (vezi: Caseta 2. A). Am ales să abordăm mai în detaliu expresia acestui factor de transcripţie datorită implicării sale în cascadele de semnalizare care controlează, în stadii embrionare mai avansate, specificarea unor structuri nervoase. Expresia *Otx-2* este detectată în ţesuturile embrionare care se consideră că emit semnale care controlează inducţia neurală, mai ales, endodermul visceral anterior şi placa precordală. *Otx-2* este însă exprimat şi în ţesuturile care au competenţa de a răspunde la aceste semnale, este vorba de ectoderm şi neuroectoderm anterior (Simeone & colab., 1993; Ang & colab., 1994). *Otx-2* are un rol secvenţial: la începutul gastrulaţiei, se consideră că reprezintă un semnal care să asigure transcripţia propriei gene în ectodermul adiacent, iar, după inducţia neurală, expresia *Otx-2* este necesară în placa precordală. În al doilea caz, semnalul *Otx-2* cu origine în placa precordală are rolul de a menţine caracterul anterior al neuroectodermului din această zonă; acest semnal este limitat posterior de un semnal represor care vine de la formaţiunea mezodermală posterioară, norocordul (Rhmn & colab., 1998). Despre aceste semnale antagonice vom vorbi mai detaliat la morfogeneza mezencefalului şi rombencefalului, unde vom expune experimente de o eleganţă deosebită, foarte reprezentative pentru eficienţa metodelor moleculare în descrierea morfogenezei neurale. Deci, *Otx-2* are rol în inducţia neuroectodermului anterior, iar, apoi, în specificarea teritoriului prozencefalului şi mezencefalului. Fenotipul homozigot de şoarece *Otx-2 1* este neviabil, neputându-se forma neuroectodermul rostral şi derivatele sale (prozencefal, mezencefaJ şi rombencefal rostral) şi prezentând o morfogeneza deficitară a formaţiunilor

mezodermale, mai ales a plăcii precordale (Acampora & colab., 1995; Matsuo & colab., 1995; Ang & colab., 1996). Disfuncţionalitatea plăcii precordale se consideră că este responsabilă de lipsa neuroectodermului rostral care pare să nu se poate forma fără semnalul *Otx-2* (pentru o sinteză, vezi: Simeone, 1998 sau Acampora & colab., 2001).

După ce am prezentat şi aceste date, putem să descriem măcar o parte din mecanismele de reglare moleculară a inducţiei neurale. De dragul conciziunii, preferăm să enunţăm acest rezumat didactic: 1. se formează şanţul primitiv din celulele epiblastului posterioarexpresie extinsă a semnalizării factorilor TGF-/?; 2. şanţul primitiv se alungeşte şi apare în partea sa cea mai rostrală nodul sau organizatorul – expresia TGF-/? se restrânge în zona adiacentă şanţului primitiv; 3. alungirea şanţului primitiv şi invaginarea progresivă a epiblastului la nivelul organizatorului şi formarea plăcii precordale şi, apoi, a norocordului, conduce la împingerea endodermului visceral anterior spre polul embrionar rostral – AVE exprimă *Hex* şi cerberus, iar placa precordală şi norocordul exprimă mai ales cordina şi noghină; toate cele patru molecule limitează spaţial semnalizarea BMP pentru a se putea produce inducţia neurală; 4. AVE, împreună, probabil, cu placa precordală, dar şi cu semnale venite de la organizator, au rolul de organizator al capului – un semnal necesar pentru inducţia neuroectodermului rostral este expresia *Otx-2;* 5. specificarea anterioară mediată de semnale de la AVE este

limitată posterior de semnale antagonice de la mezodermul posterior (de ex., antagonismul *Hexicordină).* Evident, aceasta este o simplificare a controlului molecular al inducţiei neurale, dar ne este utilă pentru a ilustra antagonisme moleculare care modelează ţesuturile embrionare.

Studiind expresia diferitelor gene, s-a ajuns la concluzia că neuroectodermul este modelat prin intermediul a două categorii de semnale: semnale verticale şi semnale planare. Inducţia verticală este controlată de ţesuturi care sunt localizate sub neuroectoderm, mai ales mezodermul. Am văzut cum prin jocuri de antagonisme genetice, diferitele porţiuni ale mezodermului stabilesc specificarea antero-posterioară a axului neural, dar participă şi la specificarea caracterului medio-lateral în placa neurală sau, corespunzător,

ventro-dorsal în tubul neural (pentru detalii, vezi: Lumsden & Krumlauf, 1996, dar şi: Doniach, 1993; Ruizi Altaba, 1993).

2.1.2 Rolul plăcii precordale şi norocordului în inducţia neurală

Avem deja o schemă a mecanismelor prin care mezodermul controlează inducţia şi specificarea antero-posterioară a neuroectodermului. Vom discuta în continuare particularităţile fiecărei formaţiuni mezodermice, respectiv, placa precordală, primul derivat mezodermic rezultat prin invaginarea celulelor epiblastului la nivelul organizatorului, şi norocordul, care este localizat sub restul plăcii neurale.

Să recapitulăm, mai întâi, cum se formează aceste structuri la embrionul de găină, de pildă: prin invaginarea celulelor epibâastului ia nivelul nodului Hensen, în timpul gastrulaţiei rezultă două populaţii de celule care vor delimita placa precordală şi norocordul. În faza iniţială, norocordul se numeşte proces al capului *(headprocess;* pentru detalii, vezi: Lillie, 1952) şi este încă în contiguitate cu placa precordală sub placa neurală, limita sa rostrală fiind la nivelul caudal al viitorului diencefal, iar limita caudală fiind delimitată de nodul lui Hensen care este în curs de regresie. Regresia nodului are loc în fazele numite, după clasificările standard, stadiile curburii cefalice *(head fald)* (pentru clasificări ale stadiilor morfologice embrionare, vezi: Hamburger & Hamilton, 1951/1992, dar şi: Downs & Davies, 1993). Deci, norocordul se formează din celulele epiblastului care sunt invaginate şi lăsate în urmă de nodul în regresie. Norocordul va ajunge, astfel, să fie localizat sub cea mai mare parte a plăcii neurale. La stadiul 3 + (Hamburger & Hamilton, 1951/1992), când şanţul primitiv a ajuns la lungimea maximă, celulele epiblastului care sunt invaginate la nivelul organizatorului exprimă la început trei gene homeotice: *gsc (goosecoid), cnotl* şi *cnot2.* Celulele care exprimă *gsc* se separă progresiv şi migrează spre polul anterior cu aprox. 400 um. La stadiul 5, aceste celule delimitează placa precordală. Posterior, se situează procesul capului, care exprimă cu un gradient antero-posterior *gsc,* a cărui expresie scade, deci, către posterior şi *cnotl/2* a căror expresie predomină spre posterior. După stadiul 6, când s-a terminat morfogeneza norocordului, segregarea este completă: celulele care exprimă *gsc* constituie placa precordală, iar cele care exprimă *cnotl/2* alcătuiesc

norocordul (Stein, NIB & Kessel, 1996; Niehrs & colab., 1993; pentru o sinteză, vezi: Stein & Kessel, 1995). În final celulele plăcii precordale contribuie la formarea mușchilor extrinseci ai ochiului, iar celulele norocordului participă la morfogeneza discurilor intervertebrale și, în parte, a vertebrelor (vezi: Hamilton, Boyd & Mossman, 1962).

Proprietățile de organizator ale nodului au ridicat problema dacă nu cumva și derivatele mezodermice ale acestuia au aceeași capacitate (vezi: mai sus). Mai intuitiv, contactul intim dintre mezoderm și ectoderm a condus la studierea rolului norocordului și plăcii precordale în inducția neurală, specificarea antero-posterioară și regionalizarea plăcii neurale (pentru o sinteză, vezi: Beddington & Robertson, 1999; Martínez & Simeone, 1999, pp. 1 – 8).

Am prezentat deja experimentele efectuate inițial de Spemann în care se arăta că noduri tinere pot induce o axă neurală completă, în timp ce noduri izolate în timpul regresiei nu mai pot induce neuroectodermul rostral. Replici ale acestor experimente au condus la concluzia că doar primele derivate mezodermice, adică placa precordală și procesul capului, pot specifica o soartă anterioară a neuroectodermului (pentru detalii, vezi: Storey & colab., 1992). O concluzie mai timpurie a lui Hara (1978) sugera că se poate considera că placa precordală conservă integră capacitatea de semnalizare a nodului. Dincolo de aceste formulări teoretice, abordarea moleculară nu a putut tranșa dacă mezodermul precordal controlează sau nu specificarea neuroectodermului rostral. O altă problemă este dacă și mezodermul paraxial are capacitatea de semnalizare a inducției neurale. Sarcina noastră, foarte grea cu datele existente, este să favorizăm anumite concluzii și seturi de date experimentale. Pentru alte puncte de vedere asupra acestor probleme, trimitem la sinteze publicate recent (de pildă, Kiecker & Niehrs, 2001).

Să analizăm întâi datele existente despre capacitatea de organizator a plăcii precordale. Așa cum am arătat, placa precordală se află sub teritoriul prospectiv al prozencefalului (pentru detalii anatomice, vezi: Seifert, Jacob & Jacob, 1993). Un prim set de date obținute la embrionul de găină arată că placa precordală controlează inducția neurală și specificarea antero-posterioară (Pera & Kessel, 1997). Embrionul de găină oferă avantajul că placa precordală poate fi discriminată ușor morfologic și molecular de norocord. De asemenea,

la embrionul de găină există o arie posterioară numită arie opacă, cu soartă extraembrionară, deci, care nu contribuie nici la neuroectoderm, dar care s-a arătat că poate răspunde la semnale de inducţie neurală emise de segmente de organizator grefate local, oferind, deci, un segment nediferenţiat de ţesut embrionar cu competenţă de neuralizare (Dias & Schoenwolf, 1990). După această digresiune despre modelul experimental. oferit de embrionul de găină, revenim la rezultatele experimentelor, care au indicat că placa precordală poate specifica neuroectodermul anterior. Pera şi Kessel (1997) au analizat capacitatea plăcii precordale de a controla inducţia neurală prin transplantarea unui segment de mezoderm sau de mezoderm împreună cu endodermul adiacent (unii susţin că ambele ţesuturi din capătul rostral al procesului capului reprezintă placa precordală, şi nu doar mezodermul; vezi: Izpisua-Belmonte & colab., 1993, respectiv, Seifert, Jacob & Seifert, 1993) într-o arie de

ectoderm nespecific din zona marginii interne a ariei opace. Rezultatele obţinute au fost următoarele: transplantarea unor segmente izolate din procesul capului a indus formarea ectopică a unor formaţiuni similare prozencefaiukii şi mezencefalului; grefele izolate din placa precordală în stadiul 5 (Hamburger & Hamiltonu 1951/1992) au indus formarea unei vezicule neurale asemănătoare prozencefalului, dar cu specificare ventro-dorsală. Deci placa precordală, faţă de procesul capului, nu poate induce decât neuroectoderm mai anterior. Grefe de plăci precordale izolate mai târziu, în stadiul 6, au indus structuri neuroectodermale mai mici, indicând o scădere în timp a capacităţii de neuralizare a plăcii precordale. Principala urmare morfologică a extirpării plăcii precordale este nesepărareaj porţiunii de neuroectoderm din care se formează în mod normal evaginaţiile optice, dezvoltându-se un singur ochi (ciclopie) în zona ventrală a tubului neural rostral. Foarte interesant, la speciile la care nu există placă precordală, ci doar norocord (urocordate, cefalocordate), indivizii au un singur ochi, ceea ce ar putea indicai faptul că placa precordală este un produs al evoluţiei, posibil, prin duplicarea genelor (de pildă, la vertebrate a fost identificată o a doua genă *gsc,* numită *gsx;* \ pentru detalii, vezi: Lemaire & colab., 1997). În concluzie, acest studiu demonstrează experimental faptul că placa precordală controlează inducţia

neuroectodemului anterior (vezi şi: Takaya, 1978).

Cine îşi închipuie însă că ştiinţele experimentale sunt lipsite de contradicţii, va avea parte în continuare de un contraexemplu. În acelaşi volum cu studiul lui Pera şi Kessel, alt grup de cercetători prezintă experimente în care arată că regiunea precordală nu poate neuraliza, dar că poate conferi un caracter anterior neuroectodermului (Foley, Storey & Stern, 1997). De dragul simetriei, facem o nouă digresiune metodologică: dacă transplantezi grefe din mezoderm în ectodermul primar din aria opacă, testezi capacitatea de inducţie neurală a grefei şi capacitatea de regionalizare pentru că ectodermul extraembrionar din această zonă trebuie convertit spre o soartă neurală. Dacă vrem să testăm numai capacitatea de regionalizare a unei grefe de mezoderm, o vom transplanta în aria clară a embrionului de găină, unde se găseşte neuroectoderm. Folosind aceste două variante de design experimental, Stern şi colaboratorii arată că grefe din regiunea precordală nu pot „convinge" ectodermul din zona opacă spre o soartă neurală, dar pot conferi un caracter anterior neuroectodermului din aria clară. Contradicţia beneficiază de date experimentale de ambele părţi. Ne eschivăm deocamdată şi remarcăm că, în timp ce Pera şi Kessel au transplantat grefe de mezoderm şi endoderm, Stern şi colaboratorii au izolat grefe din *regiunea* precordală, care cuprindeau atât ectoderm, cât şi mezoderm şi endoderm. Pe de altă parte, echipa lui Stern a folosit o metodă de identificare moleculară, dar şi morfologică, numită himerismul prepeliţă-găină. Metoda este similară procedurii experimentale prin care Spemann urmărea soarta unei grefe prelevând ţesut mai pigmentat de la un amfâbian şi transplantând-o la o specie apropiată de amfibian. Himerismul prepeliţă-găină presupune transplantarea unor grefe de ţesut embrionar de la prepeliţă la embrionul de găină; soarta grefei poate fi urmărită prin metode imunohistochimice (anticorpi monoclonali care recunosc epitopi de pe celulele de

prepeliţă). Oricum, înclinăm să credem că placa precordală controlează inducţia neurală şi specificarea antero-posterioară a neuroectodermului (pentru o argumentaţie detaliată, vezi: Kiecker & Niehrs, 2001). Am văzut deja că placa precordală este sursa unor semnale, cum ar fi cordina şi noghina, care, cel puţin, favorizează neuralizarea.

2.1.3 Conferirea caracterului dorso-ventral în tubul neural

Specificarea identităţii unui segment de neuroectoderm se referă la trei caracteristici corespunzătoare celor trei dimensiuni: dorsal-ventral (lateral-mediai în placa neurală), anterior-posterior, de-a lungul axului neural şi radial, de la suprafaţa ventriculară la cea piaţă. Mezodermul participă la specificarea axială (anterior-posterior) a neuroectodermului prin semnale verticale către ectodermul localizat mai superficial. Tot prin semnale verticale, el contribuie la polarizarea medio-laterală a plăcii neurale, respectiv, ventro-dorsală a tubului neural. El are deci, caracter de organizator primar, alături de nod (Beddington & Robertson, 1999). Specificarea antero-posterioară este unul din primele efecte ale regionalizării neuroectodermului, pe care îl împarte în ceea ce am putea numi segmente majore ale tubului neural sau, în terminologia specifică neuroanatomiei, tagme, precum şi în organizatori secundari, segmentări în interiorul tagmelor (neuromere) şi alte segmentări transversale (Puelles, 2001; vezi şi: Houchmandzadeh, Wieschaus & Leibler, 2002).

Organizatorii secundari sunt zone care, la un anumit stadiu morfogenetic al tubului neural, încep să emită semnale morfogenetice care, prin interacţiuni planare, conferă identitate neuroectodermului adiacent. Cu o formulă mai contrasă, semnale de un grup de celule controlează soarta altui grup de celule adiacente. De pildă, întreg paragraful următor va fi dedicat organizatorului istm ic, care este delimitat de constricţia dintre partea caudaia a mezencefalului şi primul rombomer, secretând semnale, cum ar fi factorul de creştere fibroblastic 8 *(FGFS, Jibroblastic growth factor),* care contribuie mai ales la morfogeneza cerebelului şi a structurilor derivate din mezşi rombencefal. După inducţia neurală şi neurulaţie, segmentele tubului neural încep să capete identitate prin apariţia unor „cuiburi" de factori de creştere, mai ales. Aceştia asigură specificarea câmpurilor de creştere a diferitelor structuri nervoase, având, deci, funcţia de organizatori secundari

Un alt efect al regionalizării este apariţia polarităţii ventro-dorsale în tubul neural. Primele celule care încep să afişeze identitate moleculară. În tubul neural sunt celulele de pe linia mediană din partea ventrală, care se găsesc în proximitatea mezodermului precordal şi axial. Aceste celule formează segmentul ventral median al tubului neural, numit placa podelei *(floor plate).* Dovezile că

mezodermul este sursa de semnale care conferă caracter ventral tubului neural sunt numeroase. Grefe de norocord plasate ectopic, de pildă, în regiunea laterală a tubului neural, induc o placă a podelei suplimentară aflată în contact cu norocordul transplantat (van Straaten & colab., 1988; Smith & Schoenwolf, 1989) sau apariţia ectopică a unor populaţii de celule specifice zonei ventrale, de pildă, motoneuronii (Yamada &

colab., 1991; pentru o sinteză, vezi: Smith, 1993). Dacă norocordul nu este prezent, celulele plăcii podelei şi motoneuronii nu se mai diferenţiază (Placzek & colab., 1990; Bovolenta & Dodd, ***1991***; Pera & Kessel, 1997). La fel, mutaţii ale norocordului împiedică formarea plăcii podelei (Odenthal & colab., 1996). Să începem să analizăm mecanismul molecular al inducţiei plăcii podelei.

În 1980, C. Niisslein-Volhard şi E. Wieschaus au descoperit proteina numită hedgehog (HH). La *Drosophila,* această proteină este secretată pentru a contribui la morfogeneza derivatelor unor segmente embrionare, cum ar fi ochii sau aripile (de pildă, Mohler & Vani, 1992). Până acum, s-au izolat cinci ortoloage ale proteinei de semnalizare intercelulară Hh: *sonic hedgehog* (SHH), *desert hedgehog* şi *indian hedgehog* (vezi: Fietz & colab., 1994), precum şi *echidna hedgehog* şi *tiggy-winkle hedgehog* (Ekker & colab., 1995, respectiv, Currie & Ingham, 1996). i Numeroase experimente au demonstrat că ventralizarea tubului neural este dependentă de semnalizarea mediată de SHH (Roelink & colab., 1994; pentru o sinteză, vezi: Tanabe, Roelink & Jessell, 1995). O dovadă este că, de pildă, la fenotipul *shh* – nu se produce specificarea ventrală a tubului neural, deci, nu apare placa podelei, şoarecii transgenici prezentând şi o atrofie accentuată a întregului craniu (Chiang & colab., 1996). Expresia *shh* este detectabilă încă de la începutul gastrulaţiei, la nivelul organizatorului şi, ulterior, în mezodermul axial şi, apoi, în placa podelei (Fig. **2.11).** Un receptor de mare afinitate pentru SHH pare să fie codat de gena *pte (patched),* a cărei expresie este perfect complementară expresiei *shh* **(Fig.** 2.12; Margo & colab., 1996; Stone & colab., 1996).

A

B

zi

wt

„*
Smad2CA

Fig. 2.11 *Expresia Shh în tubul neural ventral la embrionii de peşte zebră normali (A; wt). În B, este prezentat fenotipul SmadIA în care se observă că inducerea expresiei genei Smad2 determină extinderea teritoriului de expresie al Shh în tubul neural dorsal. Smad2 este o moleculă cu rol în transducţia semnalului Cyc, analog al moleculei Nodal la peştele zebră,* zi, zona limitans; fp, placa podelei. (Adaptat după Müller & colab., 2000, cu permisiunea autorilor)

T. M. Jessel şi colaboratorii (1993) au identificat o moleculă numită SHH care participă la specificarea ventrală a tubului neural. În primul rând, s-a arătat că semnalele derivate de la norocord sunt necesare pentru inducerea plăcii podelei. Dacă se extirpă norocordul, nu se formează placa podelei şi nu se diferenţiază nici motoneuronii (Placzek, Jessell & Dodd, 1993). Mai mult, proliferarea celulelor din zona ventrală a tubului neural pare să depindă de semnale derivate de la norocord.

54

Grefe de norocord nu determină însă creşterea proliferării celulelor la nivelul măduvei spinării (Yamada & colab., 1991), SHH având un rol mai ales neurotrofic şi neuroprotectiv, prin care poate cel mult favoriza proliferarea celulelor din zona ventrală a tubului neural (Miao & colab., 1997). În studiul amintit (Placzek, Jessell & Dodd, 1993), se arată că, dacă se extirpă numai placa podelei, la fel ca şi în cazul extirpării norocordului, nu se mai diferenţiază motoneuronii (vezi: Tanabe, Roelink & Jessel, 1995, pentru date mai recente). Celulele norocordului şi celulele neuroectodermului trebuie să fie în contact direct pentru cel puţin 18 ore ca să se producă inducţia plăcii podelei. Deci, semnalizarea SHH se realizează mai întâi de către norocord, pentru ca, după inducţia plăcii podelei, şi aceasta să exprime *Shh* pentru continuarea sau întărirea ventralizării. Această semnalizare se realizează prin contact celular direct. Limita rostrală a semnalizării este la graniţa dintre mezencefal şi prozencefal; e uşor de presupus că lipsa plăcii podelei la nivelul prozencefalului se datorează incapacităţii plăcii precordale de a induce această structură (Placzek, Jessell & Dodd, 1993). Şi ştim deja că norocordul nu poate trece peste autoritatea de organizator a plăcii precordale din cauza antagonismelor moleculare!

Mezencefal
Rombencefa A
Shh

Fig. 2.12 *Expresia Shh şi pte la embrionul de şobolan la E 14.5. Se observă expresia complementară a shh (ventral) cu pte (dorsal), astfel încât celulele din zonele dorsale ale tubului neural să poată răspunde la morfogenul shh.* (Modificat după Miao & colab., 1997)

Studii făcute la peştele zebră au arătat că, alături de SHH, la ventralizarea tubului neural mai participă şi alte molecule, cum ar fi unii factori de creştere din familia TGF-y? Două astfel de molecule sunt codate de genele *cyc (cyclops)* şi *sqt [squinf).* La fenotipul *cyc"* se formează norocordul care exprimă *shh,* dar, ulterior, embrionii prezintă o placă a podelei dezorganizată (Strähle, Blader & Ingham, 1996). Dubla mutaţie *cyc/sqt* se asociază cu lipsa mezodermului (Feldman & colab., 1998), un efect pe care l-am discutat şi în cazul fenotipului Nodal-deficient, ceea ce indică similaritatea dintre semnalizarea *cyc/sqt* la peştele zebră cu semnalizarea factorilor Nodal la păsări şi mamifere. Se pare că expresia SHH în

neuroectodenn depinde de semnalizarea asigurată de *cyc* şi *sqt,* prin intermediul unor molecule cu rol de transducţie cum ar fi Sinad-2 şi FAST-1 (pentru detalii, vezi: Müller & colab., 2000). Deci, dacă expresia SHH în norocord pare autonomă, inducerea expresiei acestei gene în neuroectodermul ventral şi apariţia plăcii podelei depinde şi de cascada unor molecule din grupa TGF-/?

V
*
H e
FP I

Fig. 2.13 *Expresia Shh la embrionul de găină în stadiile de 4 somite (A, B, C) şi 25 de somite (D). (a) Hibridizare in situ a întregii secţiuni, la care se poate observa expresia Shh la celulele de pe linia mediană ventrală. (B) Secţiune la nivelul diencefaiului: Shh este exprimată în celulele plăcii precordale. (C) Secţiune efectuată imediat deasupra nodului lui Hensen în care se remarcă expresia Shh mai puternică în placa podelei decât în norocord. (D) Secţiune la nivel caudal, sub ultima somită, în care se observă că norocordul exprimă Shh. Barele din A indică nivelurile de secţiune pentru B şi C.* Di, diencefal; PP,

placă precordală; FP, placa podelei; No, norocord; NP, placă neurală; HN, nodul lui Hensen. Scale de mărime: A, B, C = – 80 um; D = 100 fim. (Adaptat după: Teillet, Lapointe & Le Douarin (1998), cu permisiunea autorilor)

SHH este necesară pentru inducţia plăcii podelei. Acesta este un fapt demonstrat prin multe replici experimentale. Modelul avansat de echipa lui Jessell, aşa cum am văzut, se bazează pe faptul că formarea plăcii podelei este dependentă de semnalizarea norocordului. Deci, în acest scenariu, se stabileşte expresia *shh* în norocord, acesta din urmă secretă SHH care determină ventralizarea tubului neural şi apariţia plăcii podelei. Expresia *shh* este secvenţială spaţial şi temporal, la nivelul norocordului, apoi, la nivelul plăcii podelei. Principalele probe în sprijinul acestui model sunt oferite de experimentele în care s-a extirpat norocordul şi s-a

observat că placa podelei nu se mai formează şi de întârzierea cu care apare expresia *shh* în neuroectodermul ventral.

Echipa lui N. Le Douarin a oferit însă o explicaţie alternativă a efectelor extirpării norocordului (vezi: Teillet, Lapointe & Le Douarin, 1998). În anii '30, J. Pasteels a sugerat că populaţia iniţială de celule ale ectodermului rezultată prin ingresiunea celulelor epiblastului la nivelul nodului conţine atât progenitorii norocordului, cât şi progenitorii plăcii podelei; el a denumit această populaţie balama cordoneurală *(chordoneural hinge).* Le Douarin şi colaboratorii (1998) au arătat că din celulele din zona dorsală a acestei populaţii se separă progresiv progenitorii plăcii podelei **(Fig. 2.13).** Acest lucru a fost verificat molecular prin faptul că expresia unui factor de transcripţie specific plăcii podelei, numit HNF-3/? care are un rol important în specificarea axială, a fost detectată la nivelul organizatorului sau balamalei cordoneurale a lui Pasteels şi, ulterior, în placa podelei. Cel mai convingător argument este că, dacă se extirpă norocordul, expresia *HNF-30* poate fi totuşi detectată în celulele de pe linia mediană a neuroectodermului ventral.

Experimentele echipei lui Le Douarin indică faptul că placa podelei nu este indusă de norocord, celulele din zona dorsală a balamalei cordoneurale migrând şi făcându-şi loc în zona ventrală mediană a neuroectodermului. Acest proces de inserţie a plăcii podelei poate fi observat în timpul neurulaţiei. Celulele plăcii podelei exprimă

shh în absenţa norocordului (Teillet, Lapointe & Le Douarin, 1998). Deci, apariţia plăcii podelei se realizează printr-un proces de inserţie, nu printr-unul de inducţie. Rezultatele anterioare care indicau lipsa plăcii podelei ca urmare a norocordectomiei se explică prin faptul că, odată cu extirparea celulelor care ar fi format norocordul, s-au extras şi progenitorii plăcii podelei. Această explicaţie este întărită, oarecum indirect, de mutaţia la peştele zebră a genei *cap plutitor (fih, floating head)* care este necesară morfogenezei norocordului (vezi: Talbot & colab., 1995, dar şi: Odenthal & colab., 1996). La fenotipul *fih* ***1*** norocordul nu se formează, iar somitele fuzionează median, sub tubul neural care *prezintă* o placă a podelei!

Am lăsat spre sfârşitul acestui paragraf o problemă care, în succesiune logică, ar fi trebuit să fie abordată la început. Este vorba de neuruiaţie, procesul prin care primordiul planar al sistemului nervos, placa neurală, se rulează, astfel că părţile laterale ale plăcii neurale se apropie şi se unesc delimitând pe linia mediană placa tavanului; populaţiile de celule din partea medială a plăcii neurale delimitează partea ventrală a tubului neural (vezi: **Fig. 2.20).** La om, acest proces are loc în a 4-a săptămână de dezvoltare embrionară. În orice manual de embriologie, neurulaţia este descrisă doar morfologic: pur şi simplu, placa neurală capătă forma unui tub! De o prezentarea mai extinsă beneficiază malformaţiile congenitale în care este afectată neurulaţia. În aceste cazuri, placa neurală poate să nu suporte neurulaţia fie numai în regiunea prospectivă a măduvei spinării (spina bifida) sau în regiunile cefalice (anencefalie), dar şi pe toată lungimea axului neural (rahischizis) (pentru detalii şi iconografie, vezi: Sadler, 1990, pp. 361 – 364). Aceste malformaţii pot să apară fie din cauză că norocordul nu a putut semnaliza corect

57

Inducţia neurală (Peters, Dormans & Geelen, 1979) sau din cauza unor factori teratogeni cum ar fi radiaţiile (Rugh & Grupp, 1960). Studii mai recente au investigat direct mecanismul molecular al neurulaţiei. Unul dintre factorii de transcripţie esenţiali pentru neurulaţie este Zz c-2, din familia proteinelor deget de zinc. La fenotipul homozigot Z/c2-deficient, neurulaţia nu se produce, embrionii prezentând spina bifida şi degenerarea măduvei spinării, precum şi defecte cefalice variind de la holoprozencefalie până la anencefalie. Expresia *Zic-2* pare să fie corelată cu viteza neurulaţiei, la

heterozigoţi fiind întârziată morfogeneza părţii dorsale a tubului neural (Nagai & colab., 2000).

2.2 Organizatorul istmic: rombencefalului şi cerebelului

Morfogeneza mezencefalului.

Regionalizarea tubului neural de-a lungul axei antero-posterioare este controlată, aşa cum am văzut, de semnale de la nivelul organizatorului primar şi, apoi, de la mezoderm şi endoderm. Într-o formulă contrasă, semnalele de la aceste ţesuturi induc expresia unor gene de-a lungul axului antero-posterior, dar şi în subdiviziuni transversale numite generic neuromere. Inducţia neuromerică este legată de specificarea identităţii diferitelor structuri, de la prozencefal, mezencefal şi rombencefal până la măduva spinării. Această fază a regionalizării este controlată de segmente de neuroectoderm numite organizatori secundari pentru că ei au rolul de a specifica soarta ţesuturilor adiacente prin diferite semnale moleculare. Până în prezent, au fost descoperiţi doi astfel de organizatori secundari: creasta neurală anterioară (ANR, *anterior neural ridge)* şi organizatorul istmic, la joncţiunea dintre mezencefalul caudal şi rombencefalul rostral.

Proprietăţile de organizator ale joncţiunii mezencefalo-rombencefalice au fost indicate pentru prima dată de echipa lui H. Nakamura şi A. Alvarado-Mallart. Rolul semnalelor susţinute de joncţiunea mez-rombencefalică a fost relevat în experimente la embrionul de găină la care transplantarea acestei porţiuni în prozencefal determină diferenţierea ţesuturilor adiacente în ţesut mezencefalic (Nakamura & colab., 1986, 1988; Alvarado-Mallart, Martínez & Lance-Jones, 1990). Capacitatea de reprogramare a neuroectodermului rostral este limitată la un inel de ţesut aflat la nivelul constricţiei dintre mezencefal şi rombencefal, numit, de aceea, organizator istmic (Alvarado-Mallart, 1993). De la aceste experimente, a început o adevărată epopee a organizatorului ismic, prin care s-au descris foarte detaliat semnalele moleculare originare la acest nivel, care sunt necesare specificării unei graniţe între neuroectodermul mai posterior până la primele rombomere şi neuroectodermul anterior, de la segmentele caudale ale mezencefalului spre polul rostral. După ce vom descrie aceste semnale moleculare, premiul pe care îl oferim este expunerea unor experimente în care cercetătorii se „joacă" cu identitatea

neuroectodermului şi pot controla inducţia ectopică a unei structuri majore cum ar fi cerebelul! Ceea ce ne garantează aceste experimente este că semnalizarea organizatorului istmic este necesară pentru regionalizarea tubului

neural şi că, actualmente, cunoaştem suficient aceste semnale pentru ca să poată fi controlată soarta neuroectodermului.

S-a arătat că mai mulţi factori de transcripţie, mai ales cei din familiile *En, Pax, Otx* şi *Gbx,* dar şi unele molecule de semnalizare cum ar fi WNT şi FGF, sunt exprimaţi la nivelul organizatorului istmic. Aşa cum ne-am obişnuit, o primă serie de dovezi care indică semnificaţia acestor molecule pentru funcţia organizatorului secundar vin din mutaţiile nule sau hipomorfe (molecula fie nu este prezentă din cauza deleţiei genei, fie este hipomorfă, datorită prezenţei uneialele a genei normale). Dar, înainte de a expune aceste experimente, să notăm că organizarea istmică cunoaşte două faze: stabilirea graniţei mez-rombencefalice şi, apoi, faza menţinerii în care începe semnalizarea activă (pentru o sinteză, vezi: Rhinn & Brand, 2001).

Să vedem mai întâi cum apare organizatorul ismic (prima fază). Un indiciu care anticipează cercetările pe care le vom prezenta este că organizatorii secundari par să se formeze la limita dintre două populaţii celulare care exprimă molecule antagonice. Două astfel de gene sunt *Otx-2* şi *Gbx-2*, primii factori de transcripţie care sunt exprimaţi în neuroectodermul anterior, respectiv, posterior, fiind, iniţial (stadiile 7 – 8 după Hamburger & Hamilton, 1951/1992), separaţi de un interval în care niciunul nu este exprimat (Wassarman & colab., 1997). Expresia celor doi factori de transcripţie se extinde astfel că, la stadiul 9, există o populaţie de celule care exprimă ambii factori de transcripţie, la nivelul joncţiunii teritoriilor din care se vor forma mezencefalul şi, respectiv, rombencefalul. După această invadare reciprocă a teritoriilor, de la stadiul 9 până la stadiul 14 – 15, *Otx-2* se retrage anterior (Hidalgo-Sanchez, Simeone & Alvarado-Mallart, 1999; pentru detalii, vezi: Garda, Echevarrfa & Martínez, 2001). Existenţa coexpresiei *Otx-2* şi *Gbx-2* indică faptul că cele două molecule nu sunt antagonice. Represia *Otx-2* se datorează unui al treilea factor, e vorba de factorul de creştere fibroblastic 8 (FGF8), a cărui expresie poate fi detectată în populaţia de celule *Otx-2*/*Gbx-2* pozitive, imediat înaintea reprimării locale a *Otx-2.* Acest

inel de celule în care apare expresia *Fgf-8* va deveni organizatorul istmic.

Înainte de a aborda rolul FGF8, să trecem în revistă datele care susţin că poziţionarea organizatorului istmic este stabilită la limita dintre *Otx-2* şi *Gbx-2.* La homozigoţii *Otx-2* ***1,*** care nu sunt viabili, lipseşte complet partea rostraia a neuroectodermului, din care s-ar fi dezvoltat prozencefalul, mezencefalul şi partea anterioară a rombencefalului (primele trei rombomere, rl-r3) (Acampora & colab., 1995; Ang & colab., 1996). Chiar embrionii *Otx-2 + –,* care prezintă o copie normală a *Otx-2* au defecte ale tubului neural anterior şi malformaţii craniofaciale (Fig. 2.14; Matsuo & colab., 1995). Complementar, la embrionii *Gbx-2* ***1*** lipseşte romencefalul anterior, iar teritoriul mezencefalului se extinde posterior (pentru detalii, vezi: Millet & colab., 1999).

Profităm de context ca să argumentăm, o dată în plus, că genele care controlează embriogeneza la insecte sunt conservate şi la mamifere. Demonstraţia poate fi impresionantă. Se ştie că genele *Otx* au o similaritate nucleotidică foarte mare cu genele *otd* de la Drosophila, mai mult, că au teritorii de expresie şi

59

fenotipuri nul-homozigote comparabile (la indivizii *ord*nu se formează neuroblaştii ganglionilor proto- şi deuterocerebrali; pentru o sinteză, vezi: Finkelstein & Boncinelli, 1994). Homozigoţii *Otx-Y****1*** prezintă defecte de morfogeneză corticală (volumul creierului este cu 25% mai redus) şi crize epileptice generalizate (Acampora & colab., 1996). Generarea unor linii transgenice de şoareci la care este prezentă gena *otd* de la *Drosophila* pe un fond *Otx-l* nul-homozigot, altfel spus, introducerea genei *otd* la progenituri ale unor şoareci *Otx-Y****1***, a. recuperat parţial aceste deficite. Deci «fe/ şi *Otx-l* sunt, cel puţin, parţial izomorfe funcţional, *otd* putând salva fenotipul *Otx-Y****1*** (Acampora & colab., 1998).

Fig. 2.1.4 *Morfologia embrionilor normali de şoarece (wt; A, stânga), respectiv, a fenotipurilor mutante Otx-2* ***hOtxl/hOtx*** *(A, dreapta) şi Gbx-2* ***1****; Otx-2* ***hOttl/hOa****>*

(B), care prezintă o trunchiere a structurilor rostrale, inclusiv a tubului neural rostral. Asterixurile indică extinderea mezenchimului la fenotipul *Gbx-2"; Otx*

2 ***hOtxuh Otxl*** *faţă de Otx-2* ***hOtxl hOtxl****. La fenotipul Gbx-2* ***1****;*

Otx-2 hOtxJ/hOtx, se

remarcă şi o fâşie subţire de epiteliu ce se întinde dinspre mezencefal

(paranteză). Tel, telencefal; Mez, mezencefal; Cb, cerebel. *Joncţiunea d*intre *srombencefal şi măduva spinării este indicată aproximativ prin capete de săgeţi.*

(Adaptat după Li că Joyner, 2001, cu permisiunea autorilor)

Activitatea organizatorului istmic este mediată de două molecule secretate:

WNT-1 şi FGF8. Să analizăm expresia acestor molecule. În fazele mai timpurii ale dezvoltării neurale, FGF8 este exprimat în regiunea în care va apărea organizatorul istmic şi porţiunea din care se va forma cerebelul, iar *Wnt-l* este exprimat maij anterior, în regiunea mezencefalului (Fig. 2.15). Mai târziu, expresia acestor molecule este limitată la două inele de ţesut în jurul constricţiei istmice: *Wnt-l* într-un inel care delimitează partea caudală a mezencefalului, iar *Fgf-B* este exprimat într-un inel de ţesut care coincide cu istmocerebelui, primordiul din care se va diferenţia organizatorul istmic şi cerebelul (vezi: Caseta 2. C şi: Bally-Cuif & Wassef, 1994). Evident, când ai o astfel de simetrie a expresiei a doua molecule, te poţi întreba care este mai importantă. Să încercăm să cântărim datele împreună. Acceptăm această provocare pentru că avem suficiente date pentru a delibera, nefiind obligaţi să conchidem împăciuitor, ca în alte cazuri, că adevărul este undeva la mijloc, constatare care, oricât de verosimilă, nu mai justifică dezbaterea!

60

Este cert că *Wnt-i* are un rol esenţial în morfogeneza mezencefalului şi a cerebelului pentru că mutaţii ale acestei gene determină lipsa unui teritoriu neural rostral, cuprinzând porţiunile din care s-ar fi dezvoltat mezencefalul şi primele rombomere sau, generic, teritoriul met-mezencefalic. *Wnt-X* are activitate mitogenică şi este coactivat cu factorii de transcripţie *En-i* şi *En-2,* care sunt exprimaţi într-un gradient de ambele părţi ale. organizatorului istmic, adică şi în mezencefalul caudal, şi în rombencefalul rostral (Dickinson, Krumlauf & McMahon, 1994). Monitorizări ale mutagenezelor la peştele zebră au indicat că mutaţii ale *Fgf-S* se asociază şi ele cu absenţa teritoriului met-mezencefalic (de ex., Shanmugalingam & colab., 2000).

Istmus

Di/

Fig. 2.15 *Diagramă în care sunt indicate teritoriile de expresie ale Wnt-l (gri) şi Fgf-8 (negru) la embrionul de şoarece în stadiul E 9.5, în relaţie cu organizarea prozomerică.* CO, cupă optică; Di, diencefal; Inf, infundibulum; Mez, mezencefal; pl, 2, 3, prozomerele 1, 2, 3; PC, placă comisurală; Proz sec, prozencefal secundar; ZI, zona limitantă intertalamică. (Modificat după Crossley & Martin, 1995)

Secvenţa temporală a expresiei acestor factori a fost descrisă indirect, prin studiul diferenţelor dintre fenotipul asociat diverseloralele ale moleculei cu domeniu pereche PAX-2.1, numite sugestiv *niciun istmus (noi, no isthmus),* de la peştele zebră (Lun & Brand, 1998). Aceste cercetări au relevat că expresia *Fgf-S* precede expresia *Wnt-i* şi *Pax-2.* \ şi că cele trei gene sunt induse separat. Exprimarea ectopică a *Wnt-l* poate induce expresia unor factori specifici segmentului met-mezencefalici, cum ar fi *En-l* şi *En-2,* dar nu poate simula activitatea organizatorului. Pe lângă faptul că FGF8 este exprimat la locul şi în perioada potrivită pentru începerea semnalizării organizatorului, adică în celulele care exprimă *Gbx-2/Otx-2,* la momentul când acesta din urmă începe să fie reprimat (stadiu 9; vezi şi: **Caseta 2. C),** aplicarea ectopică a FGF8 poate înlocui semnalizarea organizatorului. Tehnica experimentală cea mai folosită constă în implantarea unor aşa-numite „paturi" de FGF8 obţinute prin menţinerea unor

Caseta 2.C

EXPRESIA ŞI ROLURILE FGF8

Factorii de creştere sunt molecule care controlează procesele mitotice şi trofice prin interacţiunea cu suprafaţa celulei sau cu un receptor intracelular, şi care pot fi diferenţiaţi de agenţii endocrini prin faptul că pot avea multiple locuri de sinteză şi pot acţiona la nivelul unor diverse ţesuturi-ţintă (Bradshaw, 1996). Dintre factorii de creştere, cei mai extensiv studiaţi sunt factorul de creştere neuronal din familia neurotrofinelor (NGF, *nerve growth factor;* pentru detalii, vezi: Levi-Montalcini, 1986 şi referinţele), familiile factorilor de creştere epidermal (EGF, *epiderma! growth factor;* vezi: Cohen, 1986 şi referinţele) şi a factorilor de creştere fibroblastic (FGF, *fibroblastic growth factor).*

Familia factorilor de creştere fibroblastic include nouă factori

cunoscuţi (FGF 1 – 9), cu o puternică acţiune mitogenă şi neurotrofică, chiar şi în concentraţii mici (pentru o sinteză, vezi: Basilico & Moscatelli, 1992, dar şi: Burgess & Maciag, 1989). FGF sunt molecule secretate care interacţionează cu receptori de mare afinitate din familia receptorilor tirozin-kinazici (mai ales TrkA şi C), dar şi cu alţi receptori de afinitate mai mică (pentru detalii, vezi: Johnson & Williams, 1993). Studierea expresiei diverşilor FGF a indicat că aceştia sunt activi în timpul embriogenezei.

Fgf-8 este, poate, cea mai complexă genă din familia factorilor de creştere fibroblastici. Argumentele sunt numeroase: în primul rând, pentru că poate coda cel puţin şapte proteine similare (izoforme), care au un motiv comun, dar care diferă la capătul 5, numită, de aceea, informai, şi regiune variabilă (Crossley & Martin, 1995). Dintre aceste izoforme, prima pare să fie cea predominant exprimată în timpul embriogenezei. Gena *Fgf-8* cuprinde trei exoni şi se găseşte în regiunea distală a cromozomului 19 (pentru detalii tehnice, vezi: Yu & colab., 1992; Zufâiga-Mejfa-Borja, Meijers & Zeller, 1993). Foarte interesant, această zonă este în vecinătatea locusurilor în care apar mutaţii responsabile de diferenţierea şi pigmentarea părului şi a pielii, precum şi dezvoltarea şi pigmentarea ochilor.

Expresia FGF8 este foarte răspândită. De dragul expunerii didactice, vom enunţa în continuare domeniile de expresie ale FGF8 în diferitele stadii de dezvoltare (pentru taxonomia stadiilor, trimitem, din nou, la: Downs & Davies, 1993). Atragem atenţia că prezenţa FGF8 mai ales în zonele de semnalizare a morfogenezei unor ţesuturi sau structuri poate constitui o adevărată „grilă de lectură" a morfogenezei:

1. *Perioada preşanţ primitiv* (6.75 – 7.25 zile după fecundaţie) şi *perioada şanţului timpuriu* (6.75 – 7.25 zile după fecundaţie); expresia *Fgf-8* este detectată în celulele ectodermului lateral, la joncţiunea ţesuturilor embrionar-extraembrionare, la început, cuprinzând numai o jumătate din circumferinţa epiblastului, dar extinzându-se apoi la două treimi din lungimea embrionului. Se sugerează că *Fgf-8* este exprimat în celulele \ epiblastului care sunt invaginate

primele la nivelul **nodului** şi care formează mezodermul şi ectodermul definitiv. *Fgf-S* este primul marker molecular care poate fi, deci, asociat cu regionalizarea ectodermului.

3. *Perioada târzie a şanţului primitiv*

(7.25 – 7.75 zile după fecundaţie): s-a observat că expresia *Fgf-S* scade în celulele care se îndepărtează de organizatorul primar. FGF8 este prezent local, ia nivelul nodului şi, cel mult, în ectodermul lateral faţă de nod.

4. *Regresiunea şanţului primitiv* (7.5 – 8 zile după fecundaţie): localizarea expresiei *Fgf-8* în zona nodului persistă atât timp cât există şanţul primitiv.

5. *Stadiile plăcii neurale* (de la – 8 după fecundaţie). Sunt identificate două domenii ale *Fgf-8:* la nivelul organizatorului istmic, mai ales în partea dorsală şi la polul rostral al plăcii neurale şi la nivelul celui de-al doilea organizator secundar, creasta neurală anterioară (pentru o prezentare mai detaliată, vezi: Crossâey & colab., 1996, 2001; pentru o sinteză, vezi: Wilson & Rubenstein, 2001).

Concluzia acestor studii este că majoritatea centrelor de semnalizare care controlează creşterea şi regionalizarea embrionului sunt dependente de FGF8. Dacă ar trebui să reducem numărul de markeri moleculari pentru a identifica aceşti centri organizatori, probabil, cele mai specifice gene ar fi *Fgf-8, Bmp-A* şi *Shh,* între aceşti factori existând o reglare reciprocă: de pildă, expresia ectopică a BMP-4 în prozencefal duce la reprimarea expresiilor *Fg/8* şi *Shh* în unele teritorii unde, în mod normal, apar, iar aceste efecte atrag, secundar, scăderea expresiei *Fgf-8* în partea dorsală a neuroectodermului rostral

(pentru argumente, vezi: Crossâey & colab., 2001).

Referinţe bibliografice:

Basilico, C, Moscatelli, D. (1992). *The FGF family of growth factors and oncogenes.* Adv. Cancer Res. 59, 115 – 165

Bradshaw, R.A. (1996). Growth Factors. În: Greger, R., Windhorst, U. (Eds.): *Comprehensive Human Physiology* (vol. 1, pp. 431 – 451). Springer, Berlin

Burgess, W. Hv, Maciag, T. (1989). *The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins.* Annu. Rev.

Biochem. 58, 575 – 606

Cohen, S. (1986). *Epiderma! Growth*

Factor. Physiol. or Med. (Prelegere

Nobel)

Levi-Montalcini, R. (1986). *The nerve growth factor: Thirty-five years later.* Physioî. or Med. (Prelegere Nobel) Crossâey, P.H., Martin,

G.R. (1995). *The mouse Fgfb encodes a family of polypeptides and is expressed în regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo.* Development 121, 439 – 451 Crossâey, P.H., Minowada, G., MacArthur, C.A., Martin, G.R. (1996). *Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development.* Cell 84, 127 – 136 Crossâey, P.H., Martínez, S., Ohkubo, Y., Rubenstein, J.L.R. (2001). *Coordinate expression offGF8, OTX2, BMP4 and SHH in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic and optic vesicles.* Neuroscience 108, 183 – 206 Downs, K.M., Davies, T. (1993). *Staging of gastrulating mouse embryos*

by morphological landmarks in the dissecling microscope. Development

118, 2155 – 1266

Johnson, D.E., Williams, L.T. (1993).

Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family…

Adv. Cancer Res. 60, 1 – 41

Wilson, S.W., Rubenstein, J.L. R.

(2001). *Induction and dorsoventral patterning of the telencephalon.* Neuron

28, 641 – 651

Yu, Y., Kah, H, Golden, J., Migehielsen, A., Goetzi, E., Turck, C. (1992). *An acidic Fibroblast Growth Factor protein generated by alternative splicing acts llke an antagonist.* J. exp. Med. 175, 1073 – 1080 ZMiga-Mejia-Borja, A., Meijers, C, Zeller, R. (1993). *Expression of alternatively spliced BFGF jirst coding exons and antisense MINAS dumg chicken embryogenesis.* Dev. Biol. 157, 110 – 118

suporturi heparin-acrilice în soluţii conţinând FGF8 (pentru detalii, vezi: Crossley, Martínez & Martin, 1996). După 24 h de la implantarea acestor paturi de FGF8 în porţiuni mai rostrale ale tubului neural, cum ar fi prozencefalul, expresia *Otx-2* este reprimată, iar celulele în contact cu grefa afişează expresia *En-*, *Fgf-%* şi *Wnt-* (Martínez & colab., 1999; Crossley & colab., 2001). Deci FGF8 poate controla programul de semnalizare al organizatorului istmic. Un fapt larg acceptat este că FGF8 este molecula de semnalizare primară a organizatorului istmic (pentru o sinteză, vezi: Rhinn & Brand, 2001).

Studii recente au explorat relaţia dintre cei doi factori de

transcripţie care determină poziţionarea organizatorului istmic, ca sursă de FGF8. Aceste cercetări au descris expresia *Fgf-8* la dublu-mutanţi pentru *Otx* şi *Gbx* (pentru a salva defectele de gastrulaţie prezente la embrionii *Otx-2"* care mor în stadii embrionare timpurii, *Otx-2* a fost înlocuit la şoareci cu secvenţa *Otx-l* de la oameni, fenotipul fiind, deci, *hOtx-\2/hOtx-12).* Această din urmă genă permite realizarea gastrulaţiei, dar nu poate salva lipsa morfogenezei neuroectodermului rostral (vezi: mai sus). Predictibil, lipsa *Otx-2* sau *Gbx-2* a dus la inducerea unor structuri caudale în teritorii mai rostrale, respectiv, extinderea structurilor rostrale mai caudal, mezencefalul încălcând, de pildă, graniţa normală a primelor două rombomere. FGF8 nu depinde nici de prezenţa *Otx-2,* nici de expresia *Gbx2*, dar represia *Otx-2* la nivelul organizatorului nu se poate realiza decât de FGF8 împreună cu *Gbx-2.*

„» de ntrivată resionalizarea

La fenotipuf *hOtx-\2/hOtx-\2; Gbx-2 1* nu wi – >», > – * 1 1

La fenotipul *autx-i/nuix-i;* u-w-i.lu. regionalizarea neuroectodermului corespunzător prozencefalului şi mezencefalului (Martinez-Barbera & colab., 2001). Concluzia autorilor este că:

„Interpretarea univocă a acestor descoperiri este că poziţionarea organizatorului istmic este sub controlul factorilor de transcripţie OTX2 şi GBX2 şi că apare la interfaţa dintre domeniile lor de expresie. [...] Datele noastre indică faptul că inducţia iniţială a Fgf8 în neuroectoderm nu necesită funcţia OTX2 şi GBX2. [...] De aceea, decât pentru activare, OTX2 şi GBX2 sunt necesare pentru rafinarea şi limitarea expresiei Fg/8 în istmus". i (Martinez-Barbera & colab., 2001; pp. 4798) j

64

Ce poate face, de fapt, FGF8? Această întrebare ne aduce la experimentele pe care le promiteam la începutul acestui paragraf ca premiu pentru cei care ne vor urmări. Experimentele efectuate de echipa lui S. Martínez au folosit tehnica implantării de paturi de FGF8 care să inducă expresia ectopică a *Fgf-S.* Paturile au fost plasate în trei locaţii: în mezencefal, mai anterior, la limita dintre mezencefal şi prozencefal *(pl,* primul prozomer din care se va forma pretectumul) sau chiar în teritoriul pl, din care va deriva talamusul dorsal **(Fig. 2.16).** Aproape uluitor, în ultima condiţie experimentală, la 14 zile după implantare, de-o parte şi de alta a patului s-au format două

vezicule poziţionate „în oglindă”, situate între mezencefal şi telencefal. Analiza morfologică a dovedit că aceste vezicule sunt două tectutnuri optice, care, în mod normal, se formează din peretele dorsal al mezencefalului. Mai mult, în partea ventrală a acestor vezicule au fost identificate structuri similare nucleilor oculomotori care ar trebui să derive din tegmentum, partea ventrală a mezencefalului. În partea mai laterală a patului de FGF8 cercetătorii au observat formarea ectopică a unui cerebel în care exista o zonă asemănătoare stratului granular extern în care celulele proliferau intens şi chiar celule cu o morfologie asemănătoare celulelor Purkinje. Celulele din care a derivat acest cerebel ectopic sunt cele care s-au aflat în contact direct cu patul de FGF8, lucru care, aşa cum vom vedea, corespunde caracteristicilor precursorilor cerebelului aflaţi în zonă organizatorului istmâc normal (Martínez & colab., 1999). Să ne oprim puţin şi să notăm că morfogeneza acestor structuri este indusă doar de prezenţa ectopică a FGF8! Aceasta ne poate sugera importanţa semnalizării FGF8 la nivelul organizatorului istmic şi, sigur, importanţa organizatorului pentru morfogeneza unor structuri cum ar fi mezencefalul sau cerebelul. FGF8 poate induce formarea unui organizator secundar care semnalizează morfogeneza ectopică a doua vezicule mezencefalice cu polaritate opusă (partea caudală a fiecăreia este de o parte şi de alta a patului, ca şi cum una ar fi imaginea în oglindă a celeilalte) şi a unui cerebel (Martínez & colab., 1999; Crossley & colab., 1996).

La începutul acestui paragraf, am menţionat că formarea organizatorului istmic poate fi împărţită în două faze: localizarea care, aşa cum am văzut, depinde, în principal, de antagonismul dintre doi factori de transcripţie, *Otx-2* care va delimita la sfârşitul acestei faze neuroectodermul anterior şi *Gbx-2,* care va marca neuroectodermul posterior. Antagonismul dintre *Otx-2* şi *Gbx-2* este mediat de FGF8 care începe să fie secretat în celulele care coexprimă cei doi factori de transcripţie. FGF8 reprimă şi limitează anterior teritoriul *Otx-2.* FGF8 secretat la nivelul organizatorului istmic este una din moleculele cele mai importante care, în cea de-a doua fază, de semnalizare, controlează morfogeneza unor structuri cum ar fi mezencefalul şi cerebelul. Dar care este mecanismul prin care FGF8 semnalizează aceste evenimente morfogenetice? Vom detalia puţin implicarea acestei molecule în faza de semnalizare a organizatorului istmic (a doua fază).

FGF8 poate induce expresia unor gene specifice zonei met-mezencefalice, cum ar fi: expresia propriei gene, a factorilor *En-i* şi *En-2,* dar şi *Wnt-*\. Paturile de FGF8 pot induce expresia *En-i* şi *En-2* în porţiuni mai rostrale, cum ar fi primele prozomere, teritoriu corespunzător diencefalului şi mezencefalului rostral. *Wnt!*

65

este şi ea indusă într-un inel de ţesut mai caudal de locul de implantare a patului de FGF8, dar şi pe linia mediană dorsală. *Fgf-S* este indusă într-un inel de celule în contact cu patul de FGF8, spre polul rostral. *Otx-2,* însă, este reprimat de FGF8, mai întâi într-o zonă de neuroectoderm adiacentă patului. Structurile cerebelare care se dezvoltă din celulele din zonele laterale ale patului nu exprimă niciodată *Otx-2,* ceea ce indică faptul că formarea organizatorului istmic şi a unor structuri a căror morfogeneză depinde de semnalele susţinute de acesta, cum ar fi cerebelul, depinde de reprimarea *Otx-2.* Un efect observat de Martínez şi colaboratorii (1999) în experimentele de implantare a paturilor de FGF8 în pl şi p2 este că reprogramarea unui prozomer către o soartă mai posterioară afectează întregul teritoriu al prozomerului, uneori, chiar şi prozomerul vecin. Zona cea mai rostrală în care neuroectodermul este competent de a răspunde la semnalizarea FGF8 se situează la nivelul diencefalului rostral, într-o zonă numită zonă limitantă intertalamică, la graniţa dintre p2 şi p3, care va separa ulterior talamusul dorsal de

Fig. 2.16 *Modificări morfogenetice induse de implantarea unui pat de FGF8 în regiunea Urnitei dintre pl şi mezencefal la şoarece (indicat printr-o linie corespunzătoare lui b în A). Aspect extern al creierului embrionilor la care le-a fost implantat un pat FGF8 în locaţia menţionată, în stadiul 11 + (B, vedere dorsală; D, vedere laterală), respectiv, al unor embrioni din control (C, vedere dorsală; E, vedere laterală): asterixul indică prezenţa unei vezicule ectopice între mezencefal şi telencefal, iar asterixul dublu indică o veziculă similară, situată mai rostral (anterior este la stânga). Săgeata din D indică o altă veziculă ectopică, mai mică, situată între cele vezicule ectopice mari.* pl, p2, prozomerele 1, 2; mes, teritoriul prospectiv al mezencefalului; ic, constricţia istmică; Tel, telencefal; Mb, mezencefal; Cb, cerebel; a, b, e, puncte de incizie pentru introducerea patului de FGF8. (Adaptat după Martínez & colab, 1999, cu permisiunea autorilor)

66

talamusul ventral (pentru detalii, vezi: Redies & colab., 2000). Faza iniţială de semnalizare a organizatorului istmic depinde de primele molecule a căror expresie este indusă separat: FGF8, WNT-1 şi unele gene PAX, cum ar fi PAX2.1 (pentru argumente, vezi: mai sus, dar şi: Lun & Brand, 1998).

Sumarizând, neuroectodermul rostral este competent de a răspunde la semnalizarea organizatorului istmic până la nivelul zonei limitante intertalamice. Această competenţă este operaţionalizată prin capacitatea grefelor de ţesut din zona organizatorului sau a paturilor de FGF8 de a induce expresia unor gene specifică zonei met-mezencefalice, cum ar fi *En-i* şi *En-2* sau *Fgf-8.* Experimente recente au arătat că această competenţă a neuroectodermului de a răspunde la semnalizarea istmică este limitată posterior, astfel că porţiuni de organizator transplantate în rombencefalul caudal sau la nivelul măduvei spinării îşi pierd progresiv capacitatea de a induce genele *En,* respectiv, morfogeneza ectopică cerebelară (Grapin-Botton & colab „1999). Deci, există o limită între două regiuni majore ale tubului neural: una anterioară, de la rombomerele r2 şi îl spre polul rostral, respectiv, o zonă posterioară, de la r3 spre măduva spinării. Această împărţire este susţinută, aşa cum am văzut, de competenţa neuroectodermului de a răspunde la semnale istmice. Competenţa mai scăzută sau lipsa competenţei neuroectodermului de a răspunde! a semnale istmice s-ar putea datora unor semnale posteriorizante care îşi au sursa la polul caudal al tubului neural. Gradientul unui astfel de semna! secretat la nivelul cel mai caudal al tubului neural ar putea explica scăderea graduală a capacităţii organizatorului ectopic de a induce expresia Fgf-8 şi En.

Un astfel de semnal care conferă caracter posterior neuroectodermului şi care participă, deci, la regionalizarea antero-posterioară a tubului neural este acidul retinoic (AR), forma acidă a vitaminei A. Primele indicii despre importanţa acidului retinoic în embriogeneză au venit în anii ’30 când s-a observat că deficitele experimentale de vitamina A în timpul gestaţiei la şobolani se asociază cu malformaţii fetale grave, mai ales ale creierului (Warkany & Schrajffenberger, 1946). În chip interesant, şi excesul de vitamina A produce efecte asemănătoare. Acest fapt a fost în chip nefericit confirmat în anii ’80, când s-a înregistrat un număr mare de avorturi şi naşteri ale unor copii cu malformaţii congenitale severe la mamele

care, în timpul sarcinii, şi-au tratat acneea cu un medicament ce reprezenta acidul 13-cw-retinoic (vezi: Schardein, 1993). În ultimii ani, s-au descoperit receptorii prin care AR îşi exercită efectele, este vorba de factorii de transcripţie ligând-dependenţi, tipurile RAR (activaţi de toate formele *trans* şi *9 cis* ale AR) şi RXR, activaţi specific numai de formele *9 cis* ale AR (Mangelsdorf, Urnesono & Evans, 1994; Kastner, Mark & Chambon, 1995; Evans, 1988).

Printre cele mai importante gene-ţintă ale reglării expresiei RA-mediate sunt tocmai genele *shh* şi unele gene *Hox* (Anchan & colab., 1997; pentru o sinteză, vezi: Linney & LaMantia, 1994). Prin controlul exercitat asupra acestor gene, AR poate induce, atunci când este aplicat exogen la *Xenopus,* inhibarea inducţiei neuroectodermului rostral reflectată de represia completă a genei *Otx-2* (Papalopulu & Kininer, 1996; pentru o sinteză, vezi: Conlon, 1995) şi facilitarea dezvoltării structurilor embrionare posterioare (Sive & colab., 1990). Studii mai

recente au indicat că acidul retinoic este crucial pentru regionalizarea anteror posterioară a tubului neural, activând „programul" genetic al neuroectodermului posterior şi limitând expresia genelor ca *Otx-2* strict în neuroectodermul anterior; mai mult, AR pare să aibă rol şi în diferenţierea neuronală (Blumberg, & colab., 1997). Unele studii susţin că AR ar fi secretat în porţiunea posterioară şi gradientul postero-anterior ar induce expresia genelor specifice pentru neuroectodermul posterior şi ar limita (expresia genelor specifice neuroectodermului anterior. Aceste modele favorizează, astfel, modelul activării-transformării al lui Niewkoop, care susţine că, după înaducţia neurală, tot neuroectodermul are caracter anterior, confirmat astăzi prin activarea unor gene specifice, după care, factori posteriorizanţi cum ar fi AR transformă segmentele posterioare în neuroectoderm posterior.

Am menţionat că AR poate controla expresia unora din genele *Hox.* Să detaliem. Aceste gene sunt specifice mai ales rombomerelor r2-r7, ceea ce ne-ar îndreptăţi să ne aşteptăm ca morfogeneza acestor segmente ale rombencefalului să fie sever perturbată în absenţa AR. Într-adevăr, la fenotipul de prepeliţă vitamina A-deficient, aceste segmente ale rombencefalului lipsesc cu desăvârşire! Rombomerele îl şi r2 se dezvoltă normal, ceea ce susţine diferenţa dintre

rombencefalul anterior (rl-2) şi cel posterior (r3 – 7) (Fig. 2.17; Maden & colab, 1996). Faptul că lipsa AR este cauza acestei malformaţii severe este susţinută de experimente în acre se arată că, dacă se aplică o singură injecţie de AR la embrionii, de prepeliţă între stadiile O-5, înainte de a se forma rombomerele (la embrionul de găină acestea apar între stadiile 8 – 10) morfogeneza rombencefalului este salvată (Gale, Zile & Maden, 1999).

B
C
v
«i!
«I

Fig. 2.17 *Secţiuni în care se pot distinge limitele normale ale rombomerelor, ganglionii cranieni şi organizarea ganglionilor motori la embrionul norfnal de prepeliţă (a). În B, este prezentată o secţiune efectuată la fenotipul vitamina A-deficient: un ganglion trigemen normal, dar lipsesc nervii facial, glosofaringial şi vag. C confirmă că o singură injecţie de retinol salvează fenotipul vitamina A-deficient.* (Adaptat după Gale, Zile & Maden, 1999, cu permisiunea autorilor)

Regionalizarea tubului neural este vizibilă morfologic prin apariţia, mai ales în zone cum ar fi rombencefalul, a unor ondulaţii pe suprafaţa internă a neuroectodermului, ondulaţii care, la nivelul rombencefalului, se numesc rombomere (Õrr, 1887; Vaage, 1969). Semnificaţia acestor segmente transversale a rămas neclară până recent, când neurobiologia celulară şi moleculară au putut

stabili că rombomerele sunt unităţi organizatorice ale rombencefalului. S-a stabilit astfel că rombomerele au o identitate moleculară oferită în primul rând de expresia genelor *Hox.* Cu alte cuvinte, acest segment al tubului neural ilustrează cel mai bine principiul colinearităţii observat în cazul genelor homeotice (vezi: Caseta 2. A). Pentru genele complexului *Hox* B, limita domeniului de expresie este următoarea, de la rostral la caudal în tubul neural şi de la capătul 3 la 5 pe cromozom: *Hoxb-2* are limita anterioară între r2 şi r3, *Hoxb-3* între r4 şi r5, iar *Hoxb-4* între r6 şi r7. Deci, fiecare pereche de rombomere, adică r2/3, r4/5, respectiv, r6/7, exprimă o identitate sau un cod *Hox,* care are rol în morfogeneza structurilor originare la nivelul fiecărui rombomer, observaţie verificată atât la păsări, cât şi la

mamifere (Prince & Lumsden, 1994; Grapin-Botton & colab., 1995). Acest cod *Hox* controlează inclusiv neurogeneza în fiecare dintre rombomere, mutaţii nule ale oricăreia dintre genele complexului *Hox* B rezultând

Fig. 2.18 *Expresia Genelor Hox în porţiunile de ţesut grefate în rombencefalul posterior al prepeliţei depinde de prezenţa ţesutului istmic sau a FGF8, Rombomerul 1 (îl), atunci când este grefat la nivelul r4 (grefa este indicată de*

asterisc), exprimă Hoxbl (a) şi Hoxa2 în absenţa ţesutului istmic. (B) În aceeaşi situaţie experimentală, când este transplantată şi o porţiune de ţesut istmic, confirmată prin prezenţa expresiei FGF8 (indicată de săgeată), expresia Hoxbl (C) şi Hoxa2 (D) nu mai este indusă. (E) o grefă de îl transplantată la nivelul r4 împreună cu un pat de FGF8 nu exprimă Hoxal. (F) şi H) Confirmarea prezenţei grefei de îl prin imunofluorescenţă în (E), respectiv, (G (limitele zonei pozitive sunt delimitate aproximativ). (H) Situaţie de control: dacă se transplantează un pat de control (săgeată) în r4, grefa de îl exprimă Hoxa2. (Adaptat după Irving & Mason, 2000, cu permisiunea autorilor)

În anomalii severe ale dezvoltării rombencefalului (pentru o sinteză, vezi: Krumlauf, 1994). Cum se stabileşte această identitate *Hox?*

Studii recente au investigat implicarea semnalizării istmice în regionalizarea rombencefalului. S-a arătat astfel că semnale provenite de la organizatorul istmic stabilesc limita anterioară a expresiei genelor *Hox,* aşa cum am descris-o anterior şi poziţionează graniţa dintre rombencefalul anterior şi posterior la limita dintre îl/2 (Irving & Mason, 2000). Aceste cercetări au folosit paradigma experimentală a implantării paturilor de FGF8, principalul morfogen secretat de organizatorul istmic. Aşa cum ne-am aştepta, atunci când se implantează în rombencefalul posterior paturi de FGF8, acestea reuşesc să inducă expresia unor gene specifice porţiunii met-mezencefalice, inclusiv îl, cum ar fi genele *En-i* şi " «-2 şi *Fgf-S* (Fig. **2.18).** Grefe de la nivelul îl pot exprima gene *Hox* dacă sunt transplantate posterior, dar nu şi dacă ele includ şi porţiuni istmice care exprimă *Fgf-S.* Genele *Hoxb-l* şi *Hoxa-2* au limita anterioară la nivelul îl/2. Dacă patul de FGF8 este implantat în il, expresia *Hoxa-2* este „împinsă" caudal. Deci neuroectodermul din îl poate răspunde la

semnale istmice. Dar, foarte interesant, atunci când patul FGF8 este implantat la nivelul r3/4, acesta nu pare să determine modificări ale codului *Hox,* expresiile *Hoxa-2* şi *Hoxb-l* rămânând nealterate. FGF8 exercită un efect mitogeuic la nivelul îl, dar nu şi la nivelul r3/4. Deci, este clar că FGF8 secretat la nivelul organizatorului istmic stabileşte identitatea îl, dar această semnalizare este limitată la graniţa r3/4 întrucât neuroectodermul posterior I nu are competenţa de a răspunde la semnale istmice (Irving & Mason, 1999, 2000). O problemă pe care se concentrează tot mai multe cercetări este cum este stabilită limita anterioară a genelor *Hox* la nivelul rombencefalului. O ipoteză consideră existenţa unui semnal secretat posterior care induce expresia acestor gene după un gradient: cu cât semnalul este mai puternic, deci, nivelul mai posterior, cu atât expresia este mai extinsă. Evident, conform acestei ipoteze, genele din clasa *Hox* sunt induse la niveluri locale specifice în care acest semnal este prezent. I Această ipoteză este convergentă cu ceea ce am discutat anterior: cu cât grefa I istmică sau patul de FGF8 e implantat mai posterior, cu atât răspunsul neuroectodermului este mai redus pentru că semnalul inductor este prezent în doze mai mari (vezi, de pildă: Alvarado-Mallart, Martínez & Lance-Jones, 1990). Acidul retinoic este considerat, deci, un candidat potrivit pentru acest semnal care conferă identitate posterioară neuroectodermului (Chen, Huang & Solursh, 1994).

Iniţial, populaţiile de precursori neuronali din toate rombomerele sunt similare, dar, pe măsura dezvoltării, diversificarea neuronală se face în acord cu rombomerul la nivelul căruia se găseşte populaţia proliferativă. Această specificare fenotipică a neuronilor ar putea fi controlată de codul *Hox* care, aşa cum am văzut, individualizează rombomerele. Dovezile în această privinţă sunt încă discutabile.

În mod normal, de la nivelul r4, iau naştere neuronii care formează nucleul motor facial (VII). Dacă este reprimată expresia *Hoxb-l* în r4, nu este perturbată neurogeneza şi specificarea acestor neuroni însă este perturbată migrarea lor.

Neuronii care formează nucleul trohlear (IV) în porţiunea cea mai anterioară a fi şi oculomotor (III), la nivelul mezencefalului apar chiar şi atunci când este perturbată

codul *Hox.* Unele studii mai recente dispută însă aceste rezultate arătând că dacă *Hoxb-i* este exprimat ectopic în il, la acest nivel este indusă apariţia motoneuronilor în partea ventrală a tubului neural, lateral faţă de placa podelei. După 4 zile, aceşti neuroni migrează normal în părţi mai laterale ale tubului neural şi, surprinzător, adoptă trei direcţii de migrare: (a) se alătură neuronilor nucleului trohlear endogen care se găseşte imediat anterior, la interfaţa dintre istmusul ventral şi partea anterioară a fi; (b) se alătură motoneuronilor nucleului trigemen (V) aflat mai caudal, în r2 şi r3; sau (c) ies din tubul neural prin partea dorsală, fasciculând independent de neuronii endogeni. *Hoxb-i* induce numai anumite tipuri de neuroni motori. Exprimarea ectopică a *Hoxa-2* în il este şi ea suficientă pentru inducţia motoneuronilor în partea ventrală, dar aceştia se alătură numai neuronilor trohleari. Concluzia favorizată este că genele *Hox* sunt capabile să confere precursorilor neuronali competenţa de a genera diverse tipuri de celule, de pildă, motoneuroni frigeminali şi/sau faciali, specifice rombomerelor unde sunt, în mod normal, exprimate aceste gene.

2.2.1 Morfogeneza cerebelului

După toate datele pe care le-am trecut în revistă, reiese că primul rombomer are un statut aparte: el nu exprimă gene *Hox,* dar poate, însă, răspunde la semnale provenite de la organizatorul istmic pentru că, astfel, este poziţionată graniţa îl/2. Deci, limita rostrală a fi este definită de organizatorul istmic, unde se găseşte şi graniţa dintre expresia *Otx-2,* anterior, şi *Gbx-2,* posterior, iar limita sa posterioară este delimitată de expresia celor mai anterioare gene *Hox,* la graniţa dintre îl/2. Mai mult, studii recente arată că cerebelul, o structură majoră care la om ocupă aproximativ o treime din capacitatea craniană, este derivat mai ales din îl **(Fig. 2.19;** Wingate & Hatten, 1999). Cerebelul pare să se formeze între aceste două graniţe, respectiv, *Otx-2/Gbx-2* şi limita anterioară *Hoxa-2* şi *Hoxb-l,* adică

Fig. 2.19 *Buza rombică se dezvoltă la contactul dintre tubul neural şi placa tavanului celui de-al patrulea ventricul. Diagrama indică localizarea buzei rombice (br) faţă de mezencefal (mez), rombencefal (rombomerele 1 şi 2, îl, 2) şi placa tavanului (pt).* (Modificat după Wingate, 2001)

Îl/2. Astfel, la fenotipul *Oix-T1",* teritoriul cerebelului se extinde

rostral, iar la *Gbx-2"* acesta se restrânge rostral. În absenţa genei *Hoxa-2,* teritoriul cerebelului se extinde caudal (Gavalas & colab., 1997), iar, când lipseşte şi expresia *Hoxb-2,* primordiul cerebelar se extinde caudal şi mai mult, până în r2 şi r3 (Davenne & colab., 1999). Această porţiune de neuroectoderm aflată între organizator şi îl/2 mai este numită buză rombică. Acum putem detalia şi vom putea înţelege apariţia unor structuri cerebelare din ţesuturile aflate lateral în contact cu paturile de FGF8 implantate anterior, la nivelul primului prozomer (vezi; mai sus; Martínez & colab., 1999).

Buza rombică apare între teritoriile *Otx-2* şi *Hoxa-2,* în partea dorsală, din placa tavanului care se întinde pe măsura dezvoltării rombencefalului deasupra îl (teritoriul cerebelar al buzei rombice), dar şi în partea dorsală a rombencefalului, formând teritoriul rombencefalic al buzei rombice. Această structură este considerată originea unor derivate cerebelare, cum ar fi celulele granulare care migrează pe suprafaţa cerebelului înainte de a fi intrat în ciclul mitotic final, în stratul granular extern, dar şi derivate precerebelare, ca, de pildă, unii nuclei pontini şi oliva inferioară, care trimit fibre muşchioase spre cerebel (vezi: Olteanu. Lupu & Miu, 2001, pp. 104 – 106). Despre morfogeneza cerebelului vom mai vorbi în alt capitol dedicat neurogenezei întrucât cerebelul este un sistem experimental clasic pentru studierea neurogenezei şi migrării neuronale. Ceea ce ne interesează la acest moment este să stabilim din ce porţiune a tubului neural ia naştere cerebelul şi care sunt markerii moleculari ai primordiului cerebelar.

Am notat că buza rombică este un paralelogram de ţesut care se găseşte în partea dorsală ari şi rombencefalului posterior. Numai din această porţiune iau naştere populaţii de celule care vor prolifera şi migra. Astfel: buza rombică cerebelară (II) dă naştere la populaţia de celule granulare care va forma stratul granular extern al cerebelului şi, în mai mică. măsură, neuroni care vor contribui la morfogeneza părţii laterale a punţii (Wingate & Hatten, 1999). Din parteaventro-rostrală a buzei rombice rombencefalice, dintr-o populaţie de celule numită reţeaua extramurală anterioară, migrează celulele care vor forma nucleul reticular mezencefalic şi alţi nuclei ai tegmentului mezencefalic (îi r2-r6). Dintr-o zonă mai dorsală a buzei rombice rombencefaiice (r3-r6/7, r7-r8), reţeaua extramurală posterioară, se vor forma nucleii vestibulari din bulb, în timp ce oliva inferioară va

deriva din partea caudală a buzei rombice rombencefalice. Buza rombică exprimă diverse gene, de pildă, *Wnt-i* şi *Pax* 6. Poate exemplul cei mai ilustrativ este cel ai genei *Wnt-l,* care, aşa cum ştim, este exprimată într-un inel de ţesut anterior de inelul FGF8-pozitiv de la nivelul organizatorului istmic, dar şi mai caudai într-o populaţie de celule de pe linia mediană dorsală (Baâly-Cuif & Wassef, 1994). Din acest segment dorsal de neuroectoderm ce exprimă *Wnt-i* şi care intră în teritoriu! buzei rombice rombencefalice derivă acea parte a celulelor din oliva inferioară care vor trimite aferente spre cerebel sub forma fibrelor agăţătoare. Oricum, celulele buzei rombice exprimă o diversitate de gene care nu pot fi considerate specifice derivatelor cerebelare. Celulele granulare cerebelare, de pildă, împart mai mulţi

markeri moleculari cu neuronii olfactivi şi neuronii granulari din gârusul dinţat decât cu alte derivate rombice.

2.3 Morfogeneza timpurie şi regionalizarea măduvei spinării. Morfogeneza timpurie a sistemului nervos periferic

Vom aborda în continuare morfogeneza măduvei spinării (Fig. 2.20). Principalul nostru scop este să descriem mecanismele moleculare şi celulare subiacente morfogenezei timpurii a sistemului nervos. De aceea, nu respectăm în prezentare relaţiile topologice dintre diferitele structuri ale sistemului nervos. În plus, cei care ne-au urmărit şi-au putut da seama că descrierea acţiunii organizatorului istmic este fundamentală pentru înţelegerea regionalizării în general, pe lângă faptul că ne-a oferit o oportunitate de a cunoaşte expresia şi cascadele moleculare în care intră numeroase gene relevante pentru morfogeneza neurală. Tocmai de aceea morfogeneza mezencefalului, rombencefalului şi cerebelului au fost expuse înaintea morfogenezei măduvei spinării.

PN

Es

N oto

Noto

Fig. 2.20 *Schema morfogenezei măduvei spinării de la placa neurală la tubul neural şi până la formarea motoneuroriilor, sub acţiunea inductoare a norocordului şi plăcii podelei, respectiv, a endodermului non-neural.* Es, ectoderm superficial (non-neural); Noto, norocord; PN, placa neurală; pp, placa podelei; pt, placa tavanului.

(Modificat după Glover, 2000)

Într-un articol recent, o autoritate în neuroembriologia moleculară, A.P. McMahon remarca faptul că, cu mai puţin de zece ani în urmă, ştiam şi am fi putut scrie foarte puţin despre dezvoltarea măduvei spinării (McMahon, 2000). Dacă cititorul acestui text baleiază chiar şi numai literatura pe care am citat-o tân

continuare, se va convinge că acest lucru este adevărat, majoritatea surselor fiindj relativ recente. Măduva spinării oferă un sistem experimental relativ simplu din!

punct de vedere al diversităţii celulare, dar şi o problemă moleculară fascinantă.

Simplitatea derivă şi din faptul că, de pildă, somatomotoneuronii pot fi identificaţi;

uşor pentru că se grupează în zone specifice ale măduvei spinării şi rombencefalului, poziţia lor putând fi corelată cu o anumită traiectorie a axonilor, respectiv, cu muşchii pe care îi inervează, principiu numit somatotopie (pentru detalii, vezi: Olteanu & Lupu, 2000, pp. 154 – 155). Neuroembriologii au fost]

preocupaţi să explice precocitatea motorie la multe specii la care nou-născuţii afişează la câteva ore după naştere o coordonare motorie rafinată. Deci, la măduva spinării, mai mult decât în oricare alt sistem experimental, evenimentele moleculare şi celulare fundamentale se întâmplă înainte de naştere. Descoperirea lor este, deci, pe teritoriul neuroembriologului!

Am detaliat mai înainte rolul proteinei SHH secretate de norocord în generarea identităţii ventrale a tubului neural. Majoritatea studiilor despre SHH au fost făcute la nivelul segmentului din tubul neural din care se va forma măduva spinării. SHH induce formarea unor tipuri de celule specifice părţii ventrale a tubului neural: concentraţii mari de SHH induc formarea plăcii podelei, iar concentraţii mai mici induc motoneuroni. După ce este indusă formarea motoneuronilor, aceştia încep să se diferenţieze, migrează spre diferite locaţii medioşi dorso-laterale şi formează coloane motorii. O coloană motorie este caracterizată de traiectoria axonilor motoneuronilor care inervează o anumită ţintă periferică (Tsuchida & colab., 1994). Au fost descrise trei coloane motorii: o *coloană motorie medială care* se extinde pe toată lungimea măduvei spinării şi

inervează musculatura axială, o *coloană motorie laterală* care se situează doar la nivel brahial, respectiv, lombar şi inervează musculatura membrelor şi o *coloană simpatică,* localizată la nivelul măduvei toracale şi segmentelor lombare superioare, care inervează ganglionii simpatici. „Spectacolul" pe care îl adaugă neuroembriologia moleculară acestei somatotopii este că neuronii fiecărei coloane pot fi identificaţi prin combinaţia de factori de transcripţie pe care îi exprimă. E vorba de factori de transcripţie din familia LIM, gene cu homeocasetă, al căror acronim generic este format din iniţialele primelor gene identificate în această familie; *Lin-11, Islet-l* şi *Mec-3* (Appel & colab., 1995). Astfel, codurile LIM pentru motoneuronii primari rostrali (şi medieni), respectiv, caudali din fiecare coloană motorie exprimă: *Islet-l/Lim3,* respectiv, *Islet-2/Lim3* (pentru o sinteză, vezi: Glover, 2000).

Se presupune că expresia acestor gene care apare înainte de creşterea axonului defineşte un cod LIM al celulei care permite exprimarea unor anumiţi receptori membranari, celula căpătând astfel chemoafinitate pentru anumite semnale care o direcţionează către anumite ţinte periferice. Aceeaşi fapt este demonstrat la *Drosophila* la care perturbarea expresiei combinaţiei specifice de gene LIM duce la modificări predictibile ale traiectoriei axonului motoneuronului (Tessier-Lavigne & Goodman, 1996). Cercetări la embrionul de găină şi la peştele-zebră au arătat dacă motoneuronii sunt transplantaţi înainte de activarea codului

LIM, cu cel puţin două ore înainte de creşterea axonului, ei se diferenţiază conform noii locaţii. Dacă sunt transplantaţi la mai puţin de o oră, aceştia se diferenţiază după codul LIM stabilit în locaţia originară (Matisse & Lance-Jones, 1996, dar vezi şi: Lance-Jones & Landmesser, 1980).

O clasă de factori de transcripţie care sunt exprimaţi în partea ventrală a tubului neural sunt codaţi de genele *Nkx.* Echipa lui Jessell argumentează că semnalizarea SHH asigură activarea unor programe de expresie a unor factori de transcripţie specifici diferitelor niveluri ventro-dorsale în primordiul măduvei spinării. Astfel, *Nkx-2.* \ este exprimat numai în neuroectodermul imediat adiacent plăcii podelei şi expresia sa este necesară pentru specificarea interneuronilor ventrali (Briscoe & colab., 1999).

Un alt membru al acestei familii, *Nkx-6.1* este exprimată foarte timpuriu într-o zonă ce reprezintă aproximativ o treime din lungimea dorso-ventrală a tubului neural. Expresia *Nkx-6.*1 este intim asociată cu cea a *Shh,* ceea ce susţine că această genă este indusă de factorul secretat în norocord: *Nkx-6. l* este exprimat în diencefal, până la zona limitantă intertalamică. *Nkx-6. l* este exprimat specific în partea ventrală a tubului neural, în populaţii de celule care contribuie la diverşi nuclei, şi anume: nucleii somatomotori trohlear, abducens şi hipoglos, formaţia reticulară mezencefalică, nucleul ventral al lemniscului lateral (r2-r3), nucleul rafeului (istmus, r7-rll) (Puelles, Rubenstein & Puelles, 2001) –, La nivelul primordiului măduvei spinării, acest factor de transcripţie ar fi responsabil de inducerea a trei fenotipuri celulare: interneuronii ventrali, motoneuronii şi interneuronii dorsali. În absenţa *Nkx-6. l* organizarea dorso-ventrală este grav perturbată, nemaiformându-se interneuronii dorsali şi motoneuronii (Sander & colab., 2000; Qiu & colab., 1998).

Un model care începe să fie favorizat în literatură susţine că populaţiile de celule de la diferite niveluri dorso-ventrale sunt specificate prin activarea unei combinaţii de factori de transcripţie, activare care reflectă gradientul ventro-dorsal descrescător al SHH. Factorii de transcripţie se împart, astfel, în două clase: clasa I: are sunt reprimaţi de SHH (de exemplu, unele gene *Pax)* şi clasa 2, induşi de îSHH, cum ar fi *Nkx-6. l* şi *Nkx-2.2.* Deci, conform acestui model, gradientul de jeoncentraţie a SHH stabileşte activarea unor factori de transcripţie în populaţiile de jprogenitori din diferite locaţii ventro-dorsale. Astfel, soarta unui progenitor este determinată de locaţia sa în tubul neural: cu cât mai ventrală, cu atât mai mare poncentraţia de SHH la care este expus. „Codul" sau combinaţia de factori de (ranscripţie care este activată în progenitor va determina în ce tip de neuron jiostmitotic se va diferenţia (Briscoe & colab., 2000; pentru discuţii, vezi: McMahon, 2000; pentru o sinteză, vezi: Jessel, 2000).

2.3.1 Morfogeneza crestelor neurale în partea dorsală a tubului neural există o populaţie de celule numite creste purale (Fig. 2.21). Aceste celule migrează extensiv, se diferenţiază în numeroase buri de celule neurale şi non-neurale şi vor contribui la morfogeneza sistemului

nervos periferic, dar se vor diferenţia şi în celule epiteâiate pigmentare şi cartilaj craniofacial. La nivelul măduvei spinării, celulele crestelor neurale migrează pe două căi: o cale ventrală şi o cale dorso-laterală. Celulele care migrează pe calea ventrală se vor diferenţia în neuroni şi celule gliale care vor contribui la morfogeneza ganglionilor senzitivi şi simpatici, la morfogeneza adrenomedulară şi se vor diferenţia inclusiv în celule Schwann, celule secretoare de mielină la nivelul sistemului nervos periferic (Bronner-Fraser, 1986). Celulele care migrează pe calea dorso-laterală dau naştere exclusiv la melanocite (Le Douarin, 1974).

Placăneurală
S omită
Invaginare otică
Ectoderm – superficial
Şanţuri faiingjene

Fig. 2.21 *Diagramă care ilustrează localizarea crestelor neurale (CIN) în porţiunea laterală a plăcii neurale (zona încercuită) la un embrion de vertebrat. Se mai observă endodermul faringian şi ectodermul superficial din care se vor forma arcele şi şanţurile faringiene.* (Modificat după Frohman, Boyle & Martin, 1990)

Concepţia tradiţională susţinea că crestele neurale sunt o populaţie separată de celule care rezidă în placa neurală laterală şi ajung în tubul neural dorsal după neurulaţie. Mai ales cercetările lui M. Bronner-Fraser au arătat că crestele neurale nu sunt o populaţie distinctă în partea dorsală a tubului neural. Din celulele tubului neural dorsal se diferenţiază celulele crestelor neurale, pe linia mediană, celulele care contribuie la placa tavanului şi, lateral, neuroni comisurali (Bronner-Fraser *Să* Fraser. 1989; Selleck & Bronner-Fraser, 1996). S-a arătat că, până la închiderea tubului neural, celulele din părţile laterale ale plăcii neurale se pot diferenţia atât în celule ale neuroectodermului, dar şi în celule ale ectodermului superficial cum ar fi celule epidermaie. Să ne amintim că inducţia neurală determină îngroşarea unei porţiuni mediale a ectodermului, formându-se placa neurală, ectodermul superficial diferenţiindu-se în epidermă şi prezentând din loc în loc îngroşări numite placode neurogenice, ale căror celule vor contribui, aşa cum vom vedea, la morfogeneza sistemului nervos periferic. Deci celulele din părţile laterale ale plăcii neurale sunt! naive şi pluripotenţiale, ale putându-se diferenţia în

celule neurale sau non-neurale. I

Am descris deja acţiunea inductoare a norocordului asupra diferenţierii structurilor ventrale ale tubului neural. Echipa lui Jessell a susţinut iniţial că

semnalizarea norocordului este suficientă pentru stabilirea identităţii dorso-ventrale a-ubului neural: celulele apropiate de sursa de SHH capătă identitate ventrală, iar cele din partea dorsală se diferenţiază după fenotipuri dorsale. În acest modei, diferenţa ventral-dorsal este dată de gradientul de SHH. Această presupunere s-a dovedit falsă pentru că grefe de norocord plasate la nivelul tubului neural dorsal înainte sau imediat după neurulaţie induc ectopic celule de tip ventral, dar nu pot împiedica migrarea celulelor crestelor neurale şi formarea neuronilor comisurali (Artinger & Bronner-Fraser, 1992). Studii mai recente indică faptul că semnale pentru stabilirea identităţii dorsale a tubului neural vin de la ectodermul superficial, astfel că, dacă punem în acelaşi mediu de cultură celule prelevate din epidermă şi celule naive din neuroectoderm, acestea din urmă se vor diferenţia după fenotipuri dorsale (Moury & Jacobson, 1989; Selleck & Bronner-Fraser, 1996). *BMP*-4 şi – 7 sunt exprimaţi în ectodermul superficial în perioada în care apar crestele neurale şi sunt suficienţi pentru inducerea crestelor neurale (Liem & colab., 1995). Genele *Zic* implicate, aşa cum am văzut, în neurulaţie contribuie şi la specificarea crestelor neurale (Nakata & colab., 1997). Aceste rezultate sugerează că antagonismul dintre SHH şi membrii familiei TGF-/? determină diferenţierea celulelor neuroectodermului după fenotipuri dorsale sau ventrale.

Cum contribuie semnalizarea factorilor TGF-/9 la formarea crestelor neurale? O genă indusă de BMP este *rho-B,* care codează o proteină care se poate lega de guanozin trifosfat (GTP) influenţând astfel procese ca transducţia unor semnale extracelulare necesare pentru transcripţia unor gene, precum şi adeziunea celulară, motilitatea celulei şi ciclul celular (Hill, Wynne & Treisman, 1995; Hall, 1998). *Rho-B* este exprimată în celulele crestelor neurale după ce acestea încep să migreze, proces denumit delaminare, Delaminarea crestelor neurale presupune modificări ale citoscheletului şi exprimarea unor molecule de adeziune şi receptori necesari pentru ghidarea celulei (vezi: paragraful despre migrare neuronală din

capitolul următor). Tocmai iniţierea expresiei acestor molecule se crede că este mediată de proteina RHO B – Blocarea expresiei acestei gene împiedică delaminarea cretselor neurale (Liu & Jessell, 1999). Tot mai multe argumente experimentale din ultima perioadă susţin semnalizarea specificării celulelor tubului neural dorsal prin intermediul factorilor BMP exprimaţi de către ectodermul non-neuronal.

2.3.2 Placodele neurogenice

Aşa cum am menţionat, ectodermul superficial prezintă în zona cefalică nişte îngroşări temporare numite placode neurogenice. Celulele acestor formaţiuni contribuie la morfogeneza ganglionilor cranieni senzitivi, diferenţiindu-se atât în celule receptoare senzitive, cât şi în epiteliu senzorial (D'Amico-Martel & Noden, 1983). Situată cel mai anterior este pâacoda olfactivă, lângă polul rostral al plăcii neurale; din aceasta vor lua naştere neuronii senzitivi olfactivi. În vecinătatea zonei met-mezencefalice se formează placoda frigeminală, împărţită în pâacoda oftalmică şi maxilo-mandibulară. Caudal de placoda frigeminală este pâacoda otică, ale cărei

celule populează urechea internă, diferenţiindu-se în neuroni senzitivi ai ganglionului cranian vestibulo-cohlear (VIII), structuri epiteliale cum ar fi canalele semicirculare şi celulele ciliate din organul lui Corti (pentru detalii funcţionale, vezi: Masetto & colab., 2000). Mai posterior se formează 3 placode epibrahiale, dintre care, de pildă, prima contribuie la ganglionii geniculaţi, iar o altă placodă epibrahială asigură diferenţierea neuronilor senzitivi gustativi care inervează mugurele gustativ, acesta din urmă format din endodermul faringian (Fig. **2.22;** pentru detalii, vezi: Northcutt & Barlow, 4998). La inducţia placodelor contribuie atât semnale de la neuroectoderm, cât şi semnale locale de la ectodermul non-neural, astfel că placoda oftalmică este indusă prin semnale provenite mai ales de la organizatorul istmic, în timp ce placodele epibrahiale depind de semnalizarea BMP 7 (Stark & colab., 1997). Placodele neurogenice sunt, deci, primordiile sistemelor senzitivo-senzoriale din creierul adult (pentru detalii, vezi: Graham & Beghie, 2000 şi capitolul următor).

Fig. 2.22 *Localizarea pe axa rostro-caudală (R-C) a placodelor neurogenice.* G, placoda epibrahială geniculată; Mez, mezencefal; N,

placoda epibrahială nodală; P, placoda epibrahială petrozală; Proz, prozencefal; O, placoda olfactivă; Ot, placoda otică; r5/6, limita rombomerelor 5/6; T, „, To, placodele frigeminale, lobul maxilomandibular, respectiv, oftalmic. (Modificat după Graham & Beghie, 2000)

2.4 Morfogeneza prozencefalului

Toate cercetările expuse până acum pledează pentru faptul că tubul neural se împarte în segmente longitudinale şi segmente transversale (neuromere), care pot fi identificate prin expresia specifică a unor gene, unele fiind chiar delimitate prin deformări morfologice, creste sau indentaţii pe suprafaţa tubului neural, cum ar fi rombomerele. Ultima „redută" a revoluţiei moleculare în neuroembriologie a fost reprezentată de prozencefal, vezicula care se formează la capătul rostral al tubului neural. În ultima decadă, un adevărat val de studii a documentat existenţa a şase prozomere la nivelul prozencefalului, impunând paradigma prozomerică şi, totodată, pe cei mai importanţi actori ai acestei revoluţii ştiinţifice, dintre care L. 78

Puelles, J. L, R. Rubinstein, K. Shimamura, S. Martínez sunt numele cel mai des citate.

Dacă citim un capitol de neuroembriologie dintr-un tratat cu angajament clasic, în paradigma columnară, găsim descris că, după ce se formează prozencefalul, din părţile laterale ale acestuia iau naştere veziculele telencefalice simetrice, din care se vor diferenţia mai apoi structuri cum ar fi cortexul cerebral, ganglionii bazali şi bulbul olfactiv. Partea caudală a prozencefalului formează diencefalul, care constituie primordiul talamusului şi hipotalamusului, precum şi cupele optice, din care se va diferenţia partea neurală a retinei (Purves & colab, 2001, pp. 471 – 492; Altman & Bayer, 1995).

Placa neurală (7 – 8 somite) 10.5 zile p.c.

Fig. 2.23 *Domeniile de expresie ale BF-1 (domeniu haşurat), Otx 1 (gri), Nkx 2.1 (punctat) şi Shh (negru), precum şi ale altor gene, sugerează o organizare longitudinală şi transversală (neuromere) a plăcii neurale cefalice şi tubului neural la vertebrate,* co, cupele optice; Di, diencefal; Ist, istmus; Mez, mezencefal; Pa, Pb, Pp, plăcile afară, bazală, respectiv, a podelei; Pr, prozencefal; rl-r6, rombomerele 1 – 6; Rb, rombencefal; Tel, telencefal; p. e, după fecundaţie (Modificat după Shimamura & colab., 1995)

Paradigma prozomerică se bazează pe principiul că expresia unor gene delimitează primordiile embrionare ale structurilor neurale adulte (Fig. **2.23** şi 2.24; Puelles, 1995) şi pretinde să nu ne uităm doar la reperele morfologice care pot oferi informaţii limitate şi sunt disponibile în stadii de morfogeneză târzie a structurilor nervoase. La prima vedere, modelul prozomeric nu contrazice descrierea clasică: prozencefalul primar se diferenţiază în prozencefal secundar şi diencefal. Doar că analizele moleculare au indicat că prozencefalul secundar contribuie la formarea ochilor şi telencefalului (fapt confirmat colateral de fuziunea

79

Ots-l

Mă-2.2

Fig. 2.24 *Harta moleculară a embrionului de şoarece în care sunt indicate domeniile genelor cu homeocasetă (Hox, Emx, Dlx, En, Otx) şi cu domeniu pereche (Pax).* CP, comisura posterioară; Di, diencefal; îs, istm; Mi. mielencefal; Met, metencefal; Mez, mezencefal; MS, măduva spinării; Tel, telencefal. (Adaptat după Edelman & Jones, 1998)

celor două structuri în boli ca holoprozencefalia), partea sa faazaia fiind reprezentată de hipotalamus, inclus, în cadrul abordării tradiţionale, în diencefal. Diencefalul, format în partea caudală a prozencefalului, este delimitat de structuri ca regiunea retromamilară şi prerubrală a tegmentumulul şi, caudal, de ffexura cefalică (Rubenstein & colab., 1994; pentru o sinteză, **vezi:** Rubenstein. Se colab., 1998; Puelles, 2001). În continuare, vom detailai mai întâi anatomia prozencefalului, documentată molecular de modelul prozomeric, după care vom trece ia expunerea punctuală a unor cercetări legate de mecanismele moleculare ale morfogenezei prozencefaâuâul".

Prozencefalul este împărţit în şase prozomere, notate de la caudal spre rostral (pl-p6; Fig. 2.25) şi este limitat rostral de o formaţiune numită creasta

80

neurală anterioară sau terminală ([a nu se confunda cu crestele neurale din măduva spinării!] ANR, *anterior neural ridge).* Descrierea acestor prozomere ca primordii ale unor structuri nervoase adulte a fost documentată printr-o varietate de metode. Un prim tip de studii sunt cele care au utilizat marcarea vitală a celulelor cu markeri

cromogeni cum ar fi albastrul de Nil, sau markeri fluorescenţi. Aceste studii, care vizează realizarea unor hărţi genealogice celulare (*fatemaps*), prezintă dezavantajul că, pe măsură ce diviziunile celulare sporesc, cantitatea de marker înglobată de o celulă este înjumătăţită. O soluţie elegantă la această problemă sunt transplanturile de ţesut heterospecific, adică între specii diferite, dintre care cunoscut ne este modelul experimental himerism prepeliţă-găină. Aceste studii au arătat că pl este primordiul din care se va forma pretectumul adult. Din p2 derivă talamusul dorsal, epitalamusul, adică epifiza şi habenula. Se crede că talamusul ventral se formează din părţile alare ale p3 şi p4. Între p2/p3 se găseşte zona limitantă intertalamică **(Fig. 2.27).** Aşa cum vom vedea, aceste prozomere prezintă expresia specifică a unor gene sau, aşa cum ne-am obişnuit, coduri moleculare care controlează morfogeneza structurilor prozencefalice (Puelles & colab., 2000).

ochi

Fig. **2.25** *Identitatea structurală a porţiunilor bazale sau alare ale diencefalului şi prozencefalului secundar la vertebrate.* AH, hipotalamus anterior; Cb, cerebel; DH, hipotalamus dorsal; DT, talamus dorsal; Cânt, eminenţa talamică; Ep, epifiza; Hab, habenula; Hi, hipotalamus infundibular; îs, istmus; M-am regiune mamilară; Mez, mezencefal; Ne, norocord; Nh, neurohipofiză; Pp, placa precordală; Pt, pretectum; rl-rll, rombomerele 1-11; SPV, arie supraopto-paraventriculară; Tel, telencefal; VT, talamus ventral. Linia longitudinală punctată delimitează plăcile bazală şi afară. (Modificat după Puelles, 2001)

Prozencefalul secundar cuprinde prozomerele p5 şi pe, din care se formează ulterior o zonă pretalamică situată dorsal de teritoriul prospectiv al hipotalamusului şi, lateral, două porţiuni de neuroectoderm care vor suferi o evaginare masivă, e vorba de telencefal şi cupele optice **(Fig. 2.26).** Teritoriul telencefalului se împarte în pallium şi subpallium, la graniţa dintre domeniile de

expresie ale unor factori de transcripţie, e vorba de *Dlx* în subpallium şi *Thr-\, îi* segmentul palidal (Puelles & colab., 2000). Alte studii făcute la reptile sau păsări definesc şi existenţa temporară a unei zone intermediare (Smith Fernandez *a* colab., 1998). Porţiunea subpalidală se împarte în arie entopedunculară, pallidum şi striatum, din acesta din urmă luând naştere structuri ca nucleul caudat,

putament nucleul accumbens, nucleul central amigdalian (pentru detalii anatomice, vezii Nauta & Feirtag, 1986, pp.240 – 271).

Fig. 2.26 *(Stânga) Vedere frontală oblică a tubului neural după ce se formează placa tavanului şi încep să se dezvolte veziculele telencefalice şi optice. (Dreapta) Secţiune transversală prin telencefal (plan de secţiune aproximativ indicat în stânga prin linie continuă), la mamifere,* co, cupele optice; D, cortex dorsal; L, cortex lateral; M, cortex medial; pa, placa afară; pb, placa bazală; pp, placa podelei; pt, placa tavanului; S, septum; Str, striatum; Tel, telencefal. (Modificat după Puelles, 2001; Rubenstein & colab., 1998)

2.4.1 Morfogeneza telencefalului

Studii recente arată că inducţia telencefalului este realizată de un organizator secundar situat la nivelul ANR. ANR este delimitată morfologic la joncţiunea dintre polul rostral al plăcii neurale şi ectodermul non-neural şi! formează în tubul neural, după stadiile 9 – 10 (Hamburger & Hamilton, 1951/1992), J linia mediană dorso-rostrală, cuprinzând o mare parte din progenitorii care vor popula telencefalul. ANR este delimitat foarte, timpuriu de expresia factorului de transcripţie *Dlx-5.* Primele experimente care au indicat că ANR este un centru de semnalizare pentru inducţia telencefalică au efectuat excizarea acestei formaţiuni care s-a soldat cu reprimarea expresiei unui factor de transcripţie numit *Bf-*\, esenţial pentru dezvoltarea telencefalului şi a cupelor optice, inactivarea *Bf-i* ducând la hipoplazie telencefalică severă şi lipsa markerului molecular al componentei subpaliale a telencefalului, *Dlx-2* (Xuan & colab., 1995; Shimamura & Rubenstein, 1997). Aceleaşi experimente au indicat că FGF8, un morfogen despre a cărui acţiune am mai vorbit, este exprimat de la stadiul 4 şi că, respectiv.

ti

Fig. 2.27 *Ghid morfologic schematic pentru prozencefalul vertebratelor. Diagrama reprezintă o vedere mediană a părţii drepte a creierului (rostral, în partea superioară). Suprafaţa haşurată indică linia mediană a plăcii neurale, al cărei capăt rostral este comisura anterioară, locul închiderii plăcii tavanului la neuroporul rostral.* A, arie amigdalară; AP, aria preoptică; BO, bulb olfactiv; CA, comisura anterioară; Cb, cerebel; CO, chiasma optică; D/Sp, limita dintre

diencefal şi prozencefalul secundar; DC, cortex dorsal; DT, talamus dorsal; E, epifiză; EM, eminenţa talamică; EL, epitalamus; Hip tub, m-am hipotalamus tuberal, respectiv, mamilar; LC, cortex lateral; MC, cortex medial; Mez, mezencefal; Nh, neurohipofiză; ochi, cupe optice; Pal, pallidum; pe plexuri coroide; PT, pretectum; S, aria septală şi comisura paliala; ST, striatum; Tp, tubercul posterior; ZI, zona limitantă intertalamică. (Modificat după Rubinstein & colab., 1998)

Bf-i este indus de la stadiile 7 – 8. Deci, această succesiune temporală, ca şi rolul demonstrat al factorului de creştere în cascada celuilalt organizator secundar, istmul, susţine FGF8 ca semnalizator al ANR. Mai mult, în culturi de explanturi neurale, FGF8 poate induce expresia *Bf-l.* Fenotipul FGF8 deficient la peştele-zebră şi şoareci este asociat cu lipsa unor structuri cum ar fi cerebelul, induse de semnale de la organizatorul istmic, dar şi lipsa structurilor prozencefalice rostrale (Shanmugalingam & colab., 2000). Aceste defecte în prozencefal sunt cel mai

severe pe linia dorso-rostrală, fiind corelate cu dezorganizarea proiecţiilor axonale ce traversează linia mediană dorsală a telencefalului şi diencefalului, cum ar fi chiasma optică şi comisura anterioară.

Rolul FGF8 în semnalizarea ANR responsabilă de inducţia telencefalică a fost demonstrat recent de echipa lui J.L.R. Rubenstein (Crossley & colab., 2001). Cercetătorii au pornit de la premisa că, dacă expresiile *Fgf-S* şi *Otx-2* sunt adiacente la nivelul organizatorului istmic, poate că asocierea domeniilor de expresie ale celor două gene este specifică organizatorilor secundari. *Otx-2* poate fi detectată foarte timpuriu în placa neurală. Iniţial, *Otx-2* şi *Fgf-%* sunt coexprimate în ANR, dar, de la stadiul 5 – 6 (Hamburger & Hamilton, 1951/1992), expresia primei gene scade în regiunile în care expresia *Fgf-8* poate fi detectată la niveluri ridicate. Între stadiile 6 – 8, *Otx-2* este menţinut la periferia „cuiburilor" de *Fgf-S*. în stadiul 12, *Fgf-8* poate fi detectată şi în porţiuni mici în veziculele optice, dar domeniul său se extinde cu timpul de la nivelul plăcii comisurale, unde scade consecutiv expresia *Otx-2.* Studiul arată clar că acolo unde este întărită expresia *Fgf-S,* expresia *Otx-2* scade, acest fenomen fiind o marcă moleculară a regiunilor unde este iniţiată morfogeneza locală. Mai precis, autorii conchid că:

„Domenii de expresie noi ale *Fgfb* par să se stabilească la periferia dintre domenii de expresie preexistente ale *Otxl,* iar expresia *Otxl* scade în regiunile în care se suprapune cu expresia *Fg/8.* Aceste observaţii sugerează câteva interacţiuni reglatorii între *Otx2* şi *Fgfă: (*1) *Otxl* poate face un ţesut competent pentru expresia *Fgfă;* (2) *Otxl* limitează răspândirea auto-inducerii Fg/8 şi defineşte limitele expresiei sale; (3) *FGFS* poate fi un represor pe o rază redusă a *Otxl;* (4) FGFS poate fi un activator pe rază lungă a *Otxl*". (Crossley & colab., 2001, pp. 202 – 203)

Ceea ce am putea numi alchimia FGF8 a fost confirmată şi în aceste experimente: atunci când paturile de FGF8 au fost. implantate la nivelul telencefalului, neuroectodermul în contact cu patul a delimitat două vezicule asemănătoare celor telencefalice, despărţite de un sulcus similar sulcusului interemisferic!

Am arătat că în neuroembriologia tradiţională se considera că telencefalul derivă din partea cea mai rostrală a tubului neural, în timp ce paradigma prozomerică a arătat că acesta se formează din partea dorsală a tubului neural. Un studiu recent efectuat de Smith Fernandez şi colab. (1998), efectuat cu ajutorul metodei himerismului prepeliţă-găină, a confirmat că prozencefalul anterior dorsal este primordiul telencefalului la diverse amniote (şoarece, găină, broască, broască ţestoasă). Premisa de la care au plecat cercetătorii a fost că expresia timpurie a genelor *Dlx* şi *Emx* delimitează primordiile telencefalului la toate speciile studiate. Cele două gene sunt ortoloagele genelor *ems* şi *dil* care sunt exprimate strict în regiunea capului la *Drosophila.* Familia genelor *Dlx* cuprinde şase gene, dintre care numai *Dlx-l, 2, 5, 6* sunt exprimate în zona subventriculară în principalele regiuni proliferative ale prozencefalului, mai ales pe teritoriul ganglionilor bazali" şi septului. În faze de dezvoltare timpurii, domeniile de expresie ale *Dlx* şi *Emx* delimitează graniţa dintre structurile striato-palidale, *Emx-l* fiind exprimat în regiunile palidale dorsale, iar *Dlx-l* având un teritoriu ventromedial. Iniţial.

teritoriile *Emx* şi *Dlx* sunt despărţite de o regiune care nu exprimă niciunul din factorii de transcripţie, numită zonă intermediară (Smith Fernandez & colab., 1998).

Rolul genelor *Emx* a fost documentat prin generarea unor linii transgenice de şoareci. Animalele *Emx-Y1* nu au prezentat defecte

morfogenetice majore, în afara unei fasciculaţii dezorganizate care a dus la morfogeneza defectivă a corpului calo's şi comisurei anterioare. La fenotipul *Emx-T1* s-a observat că emisferele cerebrale şi bulbii olfactivi sunt semnificativ mai mici. Aceleaşi studii au indicat că acest factor de transcripţie este esenţial pentru morfogeneza structurilor limbice ale telencefalului, lipsa expresiei *Emx-2* fiind asociată cu lipsa girusului dinţat, unul din straturile hipocampului, uneori, întreg hipocampul fiind absent (vezi: capitolul următor).

Vom aborda în continuare morfogeneza componentei subpalidale a telencefalului. Despre morfogeneza şi regionalizarea cortexului cerebral (componenta palială) vom vorbi într-un capitol separat. Din compartimentul subpalidal delimitat de teritoriul în care sunt exprimaţi factori de transcripţie ca *Dlx-l,* iau naştere structuri cum ar fi nucleul caudat şi putamenul, precum şi globus pallidus. Aceste structuri intră în alcătuirea ganglionilor bazali, care deţin numeroase proiecţii cu cortexul cerebral via talamus şi cu nuclei implicaţi în coordonarea motorie, cum ar fi substanţa neagră şi tectumul optic. Ganglionii bazali formează un sistem numit striato-palidal, cu un compartiment dorsal şi unul ventral. Sistemul striato-palidal dorsal cuprinde striatumul, format din nucleul caudat şi putamen, alături de pallidumul dorsal, în componenţa căruia intră globus pallidus intern şi extern. Sistemul striato-palidal ventral include o componentă striată ventrală delimitată de nucleul accumbens şi o parte a tuberculilor olfactivi şi o componentă palidală (pallidum ventral) (pentru detalii, vezi: Reiner, Medina & Veenman, 1998). La om, striatumul apare în a şasea săptămână de dezvoltare embrionară.

Zona proliferativă din care migrează majoritatea celulelor ce vor popula striatumul se numeşte eminenţă ganglionară sau ventriculară, situată în partea bazală a telencefalului, în proximitatea ventriculilor laterali (vezi: capitolul următor). Această zonă proliferativă este subîmpărţită într-o zonă ventriculară, unde celulele suferă mitoza şi o zonă subventriculară, care conţine mai ales progenitori. S-a arătat că, la fenotipul *Dlx-l, 2 1,* celulele din zona subventriculară a eminenţelor ganglionare nu se mai diferenţiază şi nu migrează pentru a forma striatumul. Un alt factor de transcripţie numit MASH-I este esenţial pentru specificarea populaţiei de celule precursor din care vor deriva celulele striatumului. La şoarecii

homozigoţi MASH-1", „celulele din zona ventriculară se diferenţiază prea devreme, adică după prea puţine cicluri mitotice, astfel că o mare parte din ganglionii bazali nu se mai formează. Mai precis, striatumul este populat prin două valuri de neurogeneză în eminenţele ganglionare: primul val populează o parte din striatum numită striozom *(striosom),* iar cel de-a doilea val asigură celulele care intră în alcătuirea altei părţi a striatumului numită matrice *(matrix).* Tot mai multe studii arată că MASH-1 este asociat cu formarea striozomului, iar genele *Dlx-l* şi 2

85

sunt necesare mai ales pentru formarea matricei. La fenotipul *Dlx-l, 2* ***1****,* neuronii striozomului migrează şi se diferenţiază normal, în timp ce neuronii care ar forma matricea nu ies din zona proliferativă.

Morfogeneza prozencefalului este un domeniu la care studiile de neuroembriologie moleculară trebuie încă să mai contribuie. Deşi au început să fie publicate sinteze despre identitatea moleculară a prozomerelor, interacţiunile! moleculare care stau la baza morfogenezei şi regionalizării acestei porţiuni rostrale a tubului neural nu sunt suficient cunoscute. Situaţia este cel mai bine rezumată de **L. Puelles: ... – –;... *[.***

„La sfârşitul mileniului, prin urmare, am asistat la o schimbare importantă a paradigmei neuromorfologice în ce priveşte prozencefalul, izvorând din căutarea unor interpretări a semnificaţiei funcţiei expresiilor genelor. Aceasta a implicat o reevaluare a ideilor mai vechi privind segmentarea, dar şi o integrare a ceea ce se stabilise cu privire la zonele longitudinale. Această schimbare paradigmatică relativ recentă (sau substanţiere moleculară a unei paradigme vechi) nu a devenit încă generalizată sau nici măcar recunoscută explicit de către toţi cercetătorii, deşi a început să apară la nivelul manualelor şi atlaselor. Aceasta conduce la o confuzie considerabilă pentru că indivizi naivi încearcă inevitabil să facă compatibile [şic!] cunoştinţe prin excelenţă morfologice susţinute de literatura standard cu datele moleculare recente şi raţionamentele corespunzătoare, care sunt, parţial, reciproc incompatibile". (Puelles, 2001, pp. 699) ...

2.5 Reglarea genetică a adeziunii celulare: interfaţa molecularcelularân morfogeneza; „v < r

La sfârşitul secolului XIX, W. Roux vorbea de legile mecanicii dezvoltării embrionare *(Enwickliingsmechanik),* metodele care stăteau

la dispoziţia neuroembriologilor de la acea vreme permiţând descrierea etapelor şi transformărilor morfologice pe care le suferă diferitele ţesuturi în timpul morfogenezei (Roux, 1895). În acest paragraf, vom arăta cum aplicarea metodelor biochimiei a făcut ca embriologia să pătrundă până la mecanismele chimice care susţin mecanica morfologică embrionară.

Cercetări din ultima decadă au analizat relaţia dintre mecanismele genetice şi cascadele chimice care controlează morfogeneza neurală. În acest capitol, am ilustrat mai ales dimensiunea moleculară a morfogenezei, arătând cum limitarea expresiei spaţio-temporale a unor gene influenţează morfogeneza. De multe ori, am argumentat acest fapt analizând fenotipuri deficiente pentru unele din aceste gene, punând accent pe care este afectată formarea şi/sau regionalizarea unui teritoriu al tubului neural, adică pe corelatele morfologice ale modificării genetice. Am argumentat, deci, că manipularea expresiei unor gene (a) a fost cauza unui defect morfogenetic (B), dar nu am precizat care este mecanismul prin care A determină B. Morfogeneza neurală depinde de o serie de procese cum ar fi diviziunea celulară, adeziunea, migrarea celulară, diferenţierea şi moartea celulară. Cercetări efectuate mai ales de echipa lui G.M. Edelman au ilustrat cum expresia unor factori de transcripţie influenţează adeziunea celulară (G. M. Edelman a primit

86

Premiul Nobel pentru Fiziologie şi Medicină în 1972, pentru cercetări în domeniul structurii anticorpilor şi imunolog, le moleculară). Explicaţia acestei Miwevvte ESte simplă: o familie de proteine morforegulatoare de care depind adeziunea şi migrarea celulară sunt produsul proteic al unor gene care se află sub controlul unor factori de transcripţie, cum ar fi proteinele PAX şi HOX. Deci, în acest paragraf, discutăm relaţiile dintre mecanismele de control genetic şi factorii mecano-chimici care influenţează morfogeneza neurală (Edelman & Jones, 1993).

ES'S *

I i *m*

Fig. 2.28 *Diagrame care ilustrează specificitatea de cuplare a căderinelor în culturi de celule. (a) Celulele non-aderente rămân în suspensii distribuite. (B) Dacă în cultură sunt prezente celule care exprimă două tipuri de molecule de adeziune, de exemplu, N-caderina*

(gri închis) şi R-caderina (gri deschis), cele două tipuri de celule formează agregate separate, datorită legării homotipice a căderinelor. (C) De asemenea, celule care exprimă aceeaşi căderină, însă unele la niveluri mari (gri închis), iar altele la niveluri mai reduse (gri deschis), se segregă astfel încât cele cu niveluri mari de căderine migrează spre centrul agregatului, iar cele cu niveluri mici de căderine rămân la periferia acestuia. (Adaptat după Redies, 2001)

Neuromerele sunt secţiuni transversale care sunt delimitate de expresia anumitor factori de transcripţie, cum ar fi cei din familiile HOX şi PAX. Posibilitatea unei legături între teritoriile acestor factori de transcripţie şi moleculele de adeziune celulară (CAM, *celular adhesion molecules)* a fost sugerată prima dată de faptul că ambele sunt limitate spaţio-temporal. Moleculele de adeziune celulară demarchează limitele unor ţesuturi în timpul dezvoltării embrionare, raţionându-se pe acest temei că ele ar putea fi ţinte ale reglării moleculare efectuate de proteinele HOX şi PAX. Experimente recente arată că, într-adevăr, molecule de adeziune celulară cum ar fi molecula neuronală de adeziune celulară (N-CAM) şi LI, o moleculă de adeziune implicată în extinderea axonală *(sprouting)* şi fasciculaţie, precum şi în procese cum ar fi mielinizarea, au domenii de cuplare pentru proteinele HOX şi PAX, care permit controlul expresiei lor de către aceşti factori de transcripţie (pentru o sinteză, vezi: Edelman & Jones, 1998). – **87**

Printre moleculele de adeziune celulară, o categorie importantă include molecule care conţin domenii similare cu ale imunoglobulinelor şi care se leagă una de alta homofilic, adică o moleculă de adeziune de pe o celulă se leagă de o altă moleculă de adeziune de acelaşi tip de pe altă celulă (Fig. 2.28; Little & colab, 2001). Atunci când se leagă de o altă moleculă de acelaşi tip, N-CAM transduce semnale care reglează expresia unor gene-şi influenţează funcţiile celulare. N-CAM mediază adeziunea celulară în ţesutul nervos embrionar, dar şi în alte ţesuturi (de pildă, miocard, epiteliu renal), expresia sa fiind situată mai ales în zonele proliferative ale tubului neural. În culturi de neuroblastom, s-a arătat că segmentul promotor al N-CAM este controlat în raport doză-dependent de unele proteine din familia HOX. Ştiindu-se că proteinele HOX au un domeniu de cuplare care recunoaşte pe molecula de ADN mai ales motivul TAAT (vezi: Caseta 2. A), s-au izolat două situri de cuplare (HBS, *homeodomain*

binding site, I şi II) pentru proteinele HOX în secvenţa promotor a genei N-CAM. Aceste situri explică responsivitatea N-CAM la expresia anumitor gene *Hox,* cum ar fi *Hoxb9* sau *HoxlG* (Jones & colab, 1992, 1993).

Studii *in vivo* mai recente confirmă această ipoteză. În ziua embrionară E 11, expresia N-CAM este detectabilă în regiuni extinse pe întreg neuraxul; în porţiunea din tubul neural corespunzătoare măduvei spinării, se observă expresia N-CAM atât în regiunile dorso-laterale, expresia sa fiind corelată cu delaminarea crestelor neurale, cât şi în regiunile ventrolaterale ale tubului neural, expresia acestei molecule prelungindu-se până la E 14.5. La linii transgenice la care a fost modificată secvenţa care conţinea cele două situri de cuplare pentru proteinele HOX, expresia N-CAM s-a observat că se concentrează în regiunea ventrolaterală a tubului neural, dar lipseşte din regiunea dorso-laterală la El 1, iar la E14.5, expresia N-CAM lipseşte cu desăvârşire din măduva spinării prospectivă (Wang & colab, 1996).

Cu o strategie asemănătoare, pornindu-se de la faptul că domeniile de cuplare al factorilor de transcripţie *Pax* au specificitate mai ales pentru motive de tipul GÂTCC sau TGCCC (Chalepakis & colab., 1991), s-au izolat secvenţe de cuplare (PBS, *paired box binding sites,* şi 2) atât pentru proteine care au numai domeniul PAX, cum ar fi PAX-8, dar şi pentru proteine care au atât homeodomeniul, cât şi domeniul pereche, cum ar fi PAX-6. Deci, prin aceste secvenţe, promotorul genei N-CAM poate fi activat şi de genele Pax. Dacă secvenţele de cuplare PBS sunt nealterate, expresia N-CAM poate fi detectată la nivelul măduvei spinării mai ales în ganglionii spinali. La linii transgenice la care aceste secvenţe sunt modificate, expresia N-CAM nu mai poate fi detectată decât într-o populaţie restrânsă de celule în regiunea ventrală a măduvei spinării. Deci mutaţii ale secvenţelor prin care genele *Pax* pot interacţiona cu gena N-CAM duc la alterarea expresiei acesteia din urmă în măduva spinării embrionară, ceea ce confirmă faptul că N-CAM este o moleculă a cărei expresie este controlată de factori de transcripţie ca HOX şi PAX (Holst & colab., 1997).

Cercetările au identificat şi alte molecule de adeziune care au secvenţe de cuplare pentru proteinele HOX şi PAX. Ng-CAM *(neuron-glial cell adhesion*

molecule) şi Lî sunt molecule de adeziune exprimate exclusiv în ţesutul nervos în timpul vieţii embrionare, mai ales în neuronii postmitotici şi celulele Schwann. Această specificitate este explicată de prezenţa pe genă a unor secvenţe represoare sau elemente represoare(*silencer)* neuronal restrictive. Aceste elemente care reduc expresia unor molecule la ţesutul nervos au fost identificate şi la alte molecule specific neuronale, cum ar fi unele canale de sodiu, sinapsina, factorul de creştere derivat cerebral (BDNF, *brain derived neurotrophic factor).* Exonul de pe genele Ng-CAM care conţine aceste elemente represoare include şi o secvenţă HBS. Prin recunoaşterea acestei secvenţe, proteine cu homeodomeniu cum ar fi *Pax-3,* pot controla expresia Ng-CAM, participând, probabil, la restricţia ei în celulele nervoase (Kallunki, Edelman & Jones, 1997).

Gena moleculei de adeziune li se situează pe cromozomul X, în apropierea secvenţei a cărei mutaţie se asociază cu sindromul X-fragil. Mutaţii ale genei îl corelează cu numeroase sindroame congenitale: paraplegie spastică, retardare mintală şi afazie, hidrocefalie, agenezie a corpului calos ş.a., prezentând, deci, un interes deosebit pentru cercetători (pentru o sinteză, vezi: Wong & colab., 1995). Kallunki, Edelman şi Jones (1998) au arătat că un singur element represor neuronal restrictiv (NRSE, *neural restrictive silencer element)* este responsabil de reprimarea expresiei acestei molecule în celule non-neurale. Dacă secvenţa NRSE de pe gena îl este normală, expresia acestei gene se regăseşte mai ales în perioada perinatală, când neuronii îşi extind procese neuronale numeroase (proces denumit *sprouting)* şi are loc o sinaptogeneză masivă. Expresia îl poate fi detectată mai ales în cortexul cerebral şi talamus. Dacă această secvenţă este modificată, Îl este exprimat ectopic în numeroase ţesuturi non-neurale cum ar fi meningele, plexurile coroade, melanocite, ţasut conjunctiv. Deleţia NRSE de pe gena îl are două efecte antagonice: în unele ţesuturi, expresia îl este facilitată postanatal (ganglionul Scarpa, neuroni olfactivi), iar, în alte regiuni ale sistemului nervos, expresia il a fost reprimată în perioada dintre zilele postnatale P1-P10 (retină, stratul granular intern al cerebelului, cortex, striatum, hipocamp) (Kallunki, Edelman & Jones, 1998). Autorii concluzionează că NRSE reprimă numai expresia îl în ţesuturi non-neurale, dar acţionează atât ca represor, cât şi ca facilitator al

expresiei îl în diferite zone ale ţesutului nervos. Gena îl conţine şi o secvenţă de cuplare a proteinelor PAX şi HOX, secvenţă numită HPD. Această secvenţă explică responsivitatea II la semnalizarea mediată de proteine morfogenetice osoase ca BMP 2 şi 4, dar şi reglarea expresiei II de către proteine PAX ca, de pildă, PAX 6. Deleţia HPD a determinat represia îl în telencefal şi mezencefal, dar nu a avut efecte în sistemul nervos periferic, expresia îl putând fi detectată în ganglionii cranieni şi spinali (Meech & colab, 1999).

Controlul exercitat de factori de transcripţie din familiile *Hox* şi *Pax* asupra moleculelor de adeziune ar putea fi un mecanism general al morfogenezei neurale. Aceasta pentru că rezultate destul de recente sugerează că şi alte familii de molecule de adeziune interacţionează cu factori de transcripţie. Este vorba de căderine, proteine adezive calciu-dependente (în *engl., calcium-dependent adherent proteins)* numite aşa pentru că agregarea celulelor care exprimă căderine

are loc numai în prezenţa calciului. Căderinele sunt o familie de molecule de adeziune intens studiate în ultima decadă, şi ele fiind exprimate diferenţiat spaţio-temporal. Ele sunt, în cea mai mare parte, glicoproteine membranare cu un domeniu citoplasmic, unul transmembranar şi un domeniu extracelular de care se poate lega calciul care stabilizează astfel structura căderinelor (pentru o sinteză, vezi: Redies, 2000). Prin domeniul citoplasmic, căderinele formează un complex cu molecule cum ar fi cateninele. Căderinele se găsesc sub formă de monomer sau dimer, fapt care mediază funcţia lor adezivă: la nivelul sinapsei, de pildă, căderinele în configuraţie – *cis* se leagă de căderinele în configuraţie – *trans* de la nivelul membranei postsinaptice, formând un adevărat „fermoar", adică mediind adeziunea membranelor pre- şi postsinaptice (Ranscht, 2000). Căderinele se pot lega heterotipic (căderine de tipuri diferite), dar adeziunea homotipică sau homofilă este mai stabilă (vezi: capitolul 4).

Neuromerele sunt delimitate nu numai de coduri sau combinaţii de factori de transcripţie, ci şi de teritoriul unor molecule de adeziune cum ar fi căderinele. La graniţa dintre două neuromere, se remarcă trecerea de multe ori abruptă de la o căderină la alta (Yoon, Puelles & Redies, 2000). În perioada perinatală (de ex., PI), expresia unor căderine cum ar fi N-caderina şi R-caderina diferenţiază numeroşi nuclei, zone din substanţa cenuşie şi chiar straturi corticale; mai mult,

expresia acestor căderine se asociază cu dezvoltarea unor circuite funcţionale, cum ar fi proiecţiile talamocorticale, unele circuite corticofugale, numeroasele proiecţii ale hipocampului şi amigdalei (Obst-Pernberg, Medina & Redies, 2001 şi capitolul următor).

Studii destul de recente au descris „codul" căderinelor exprimate de diferite zone din telencefal şi rombencefal, sugerând că regionalizarea care are loc în aceste structuri este dependentă de adeziunea diferenţială a grupurilor de celule. Am notat că echipa lui Edelman a folosit drept strategie pentru demonstrarea controlului exercitat de proteinele PAX şi HOX asupra N-CAM, de pildă, următoarea secvenţă experimentală: secvenţierea porţiunii care conţine gena unei molecule de adeziune pentru descoperirea motivelor pe care le-ar putea recunoaşte unul din factorii de transcripţie, urmată, bineînţeles, de donarea ei. După identificarea secvenţelor de tip HBS şi PBS urmează studii făcute, în cazul moleculei de adeziune de celulară neuronală, pe celule nervoase, de obicei, o linie celulară de neuroblastom în care este observat efectul deleţiei secvenţelor specifice pentru legarea factorilor de transcripţie asupra adeziunii celulelor, mediată de molecula de adeziune a cărei genă a fost modificată. Experimente *in vivo* efectuate prin generarea unor linii transgenice la care este exprimată fie gena integră a moleculei de adeziune, fie constructul la care secvenţele de cuplare a factorilor de transcripţie au fost modificate, compară teritoriul de exprimare al moleculei de adeziune în cele două cazuri în care controlul factorilor de transcripţie este posibil prin prezenţa motivelor de pe genă pe care le pot recunoaşte vs. situaţia în care posibilitatea legării lor de gena moleculei de adeziune a fost inactivată.

După această digresiune metodologică, revenim la experimentele care au indicat că şi căderinele ar putea fi sub controlul unor factori de transcripţie. A.

90

Stoykova şi colab. (1997) au studiat expresia moleculei de adeziune R-caderină, identificată specific în cortex, la fenotipul PAX-6-deficient numit intuitiv *ochi mici (Sey, Small eye).* Mutaţia genei *Pax-6* la acest fenotip se asociază cu malformarea cortexului cerebral, fără a se dezvolta cavităţile oculare şi nazale, şoarecii homozigoţi murind curând după naştere. Celulele cortexului, dar nu şi celulele striatumului exprimă *Pax-6;* la fel, primele exprimă specific R-caderina,

ceea ce ar indica faptul că această căderină mediază segregarea prin adeziune diferenţiată a celulelor cortexului, respectiv, striatumului. La fenotipul *Sey,* expresia R-caderinei este anormală, fiind semnificativ mai scăzută sau absentă în regiuni ale prozencefalului, dar, mai ales, în regiunea talamusului ventral prospectiv. Modificarea expresiei R-caderinei se asociază cu defecte morfologice cum ar fi nediferenţierea nucleilor talamusului ventral şi chiar neformarea straturilor corticale (Stoykova & colab., 1997). Deci posibilitatea unui control exercitat de gene ca *Pax-6* asupra unor mecanisme de adeziune celulară este verosimilă, cu atât mai mult în lumina demonstraţiei paralele a acestui tip de control în cazul integrinelor.

Toate aceste interacţiuni dintre factori de transcripţie a căror expresie ştim că delimitează neuromerele şi molecule de adeziune celulară explică de ce neuromere învecinate au proprietăţi adezive diferite. Factori de transcripţie diferiţi controlează exprimarea unor molecule de adeziune diferite în neuromere învecinate. Dacă celulele de la graniţa dintre două neuromere exprimă molecule de adeziune diferite, după principiul de legare homofilică ce guvernează funcţia moleculelor de adeziune, celulele nu se vor amesteca dintr-un neuromer în altul. Unele studii arată că interacţiunea celulelor prin intermediul moleculelor de adeziune se asociază cu modularea exprimării unor gene pentru că, să nu uităm, legarea homofilică a doua molecule de adeziune este o cale de semnalizare intercelulară ce ar putea modifica expresia *Hox* şi *Pax* (Edelman & Jones, 1998).

Astfel se explică unul din cele mai importante mecanisme prin care neuromerele reprezintă limite de expansiune clonală: progenitorii din cadrul unui neuromer se recunosc pentru că exprimă aceleaşi molecule de adeziune. În acest fel, factorii de transcripţie descrişi pe tot parcursul acestui capitol reglează morfogeneza sistemului nervos. Cu riscul de a fi acuzaţi că abuzăm de citate, aducând, totuşi, în apărarea textului nostru, faptul că, de multe ori, formulele cercetătorilor pot oferi perspective discrete (sau, altfel spus, când importi o revoluţie ştiinţifică, la început, e mai bine să citezi decât să parafrazezi!), reproducem consideraţiile finale ale unui articol de sinteză al lui G.M. Edelman şi F.S. Jones:

„Este deci o conjectură plauzibilă că o reţea bogată de controluri reglatorii este responsabilă de [formarea] reţelelor neuronale reale. Oricât de bogată s-ar dovedi această reţea, este probabil că un circuit

morforeglator ce implică expresia CAM, legarea CAM şi modularea recursivă a genelor din familiile cu homeocasetă şi *Pax* să fie o trăsătură centrală a morfogenezei neuronale". (Edelman & Jones, 1998, pp. 350)

2.6 Rezumat

Aplicarea metodelor moleculare în neuroembriologie a condus la obţinerea unui număr mare de date despre expresia şi funcţia unor molecule care controlează sau participă la morfogeneza şi regionalizarea timpurie a sistemului nervos. S-a observat că o parte din aceste gene au o expresie limitată spaţial şi temporal şi pot servi, deci, ca markeri pentru identificarea câmpurilor de creştere celulare din care se formează o structură nervoasă.

Cele mai importante clase de astfel de gene sunt factorii de transcripţie (clasele *Hox, Pax* şi *interval cefalic)* şi moleculele de semnalizare (factori din familiile FGF şi TGF/?). Gastrulaţia este un eveniment embrionar controlat de semnalizarea de către organizatorul primar, descris pentru prima dată de H. Spemann. Mezodermul şi ectodermul non-neural sunt principalele surse de semnale pentru inducţia neurală, prin molecule ca SHH, respectiv, factori de creştere din familia TGF-/? La apropierea părţilor laterale ale plăcii neurale şi neurulaţie participă unii factori de transcripţie, cum ar fi *Zic-2.* Regionalizarea pe axa antero-posterioară a tubului neural presupune şi ea controlul spaţio-temporal al expresiei unor molecule. Această limitare spaţio-temporală a expresiei unor molecule este semnalizată de la nivelul unor formaţiuni numite organizatori secundari, fiind identificate două astfel de structuri numite organizatorul istmic, care controlează morfogeneza mezencefalului, rombencefalului şi cerebelului şi creasta neurală anterioară, responsabilă de regionalizarea timpurie a prozencefalului. Expresia specifică a unor factori de transcripţie nu numai că discriminează între mai multe câmpuri de creştere, dar şi participă la limitarea acestora. Unele molecule de adeziune care controlează contactul şi adeziunea dintre celule au domenii de cuplare pentru şi expresia lor este reglată de factori de transcripţie din familiile *Hox* şi *Pax.* Adeziunea homofilică face ca o celulă dintr-un câmp de creştere să aibă adeziunea cea mai stabilă cu o celulă din acelaşi câmp de creştere, pentru că aceste celule exprimă aceiaşi factori de transcripţie care determină expresia

aceloraşi molecule de adeziune.

92

REFERINŢE BIBLIOGRAFICE:

— Referinţe recomandate Referinţe de mare interes

Acampora, D., Gulisano, M., Broccoli, V., Simeone, A. (2001) *Otxgenes în brain morphogenesis.* Prog. Neurobiol. 64, 69 – 95

Sinteză în care este descris rolul genelor *Otx* în specificarea, regionalizarea şi maturarea segmentului rostral al sistemului nervos central. Acampora, D., Mazan, S., Lallemand, Y., Avantaggiato, V., Maury, M., Simeone.

A., Brulet, P. (1995) *Forebrain and midbrain regions are deleted în Otx2*

— *mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation.* Development 121, 3279 – 3290 Acampora, D., Mazan, S., Avantajatto, V., Barone, P., Tuorto, F., Lallemand, Y.

Brulet, P, Simeone, A. (1996) *Epilepsy and brain abnormalities în mice lacking the Otxl gene.* Nat. Genetics 14, 218 – 222 „Acampora, D., Avantajatto, V., Tuorto, F., Barone, P., Reichert, H., Finkelstein.

R., Simeone, A. (1998) *Murine Otxl and Drosophila otd genes share conserved genetic functions required în invertebrate and vertebrate brain development.* Development 125, 1691 – 1702

Caractere ca activitatea epileptiformă şi defectele de corticogeneză, dar nu şi defectele de morfogeneză a urechii interne, asociate fenotipului homozigot *Otx!*

defectiv, sunt salvate prin exprimarea genei ortoloage de la *Drosophila,* este vorba de gena *otd.* Aceasta susţine echivalenţa funcţională, cel puţin parţială, a factorilor de transcripţie *Otx* şi *otd* de la mamifere şi *Drosophila,* respectiv. Altman, J., Bayer, S.A. (1995) *Atlas of prenatal rat brain development.* CRC

Press, Boca Raton Alvarado-Mallart, R.M. (1993) *Fate and potentialities of the avian mesencephalic/metencephalic neuroepithelium.* J. Neurobiol. 24, 1341

1355 Alvarado-Mallart, R.M., Martínez, S., Lance-Jones, C. C. (1990) *Pluripotentiality of 2-day-old avian germinative neuroepithelium.* Dev. Biol. 139, 75 – 88 Anchan, R.M., Drake, D.P., Haines, C.F., Geme, E.A., Lamantia, A.S. (1997)

Disruption of local retinoid-mediated gene expression

accompanies abnorma! development in the mammalian olfactory pathway. J. Comp.

Neurol. 379, 171 – 184 Ang, S.L., Wierda, A., Wong, D., Stevens, K.A., Caseio, S., Rossant, J., Zaret, K.

S. (1993) *The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins.*

Development 119, 1301 – 1315 Ang, S.L., Conlon, R.A., Jin, O., Rossant, J. (1994) *Positive and negative signals front mezoderm regulate the expression of mouse Otx2 în ectoderm explants.* Development 120, 2979 – 2989 Ang, S.L., Jin, O., Rhinn, M., Daigle, N., Stevenson, L., Rossant, J. (1996) *A*

targeted mouse Otx2 mutation leads to severe defects în gastrulation and

formation of axial mezoderm and to deletion ofrostral brain. Development

122, 243 – 252 Appel, B., Korzh, V., Glasgow, E, Thor, S., Edlund, T., Dawid, I.B., Eisen, J. S.

(1995) *Motoneuron făte specification revealed by patterned LIM*

homeobox gene expression in embryonic zebrafish. Development 121.

4117 – 4125 Arthur, W. (2002) *The emerging conceptual framework of evoluționay developmental biology.* Nature 415, 757 – 764 „Artinger, K.B., Bronner-Fraser, M. (1992) *Norochord grafts de noi supress formation of neural crest cells or commissural neurons.* Development 116.

877 – 886

Un studiu în care se arată clar că grefe de norocord plasate în porţiunea dorsală a tubului neural nu alterează formarea crestelor neurale, dar afectează uşor mărimea şi locaţia unor derivate ale crestelor neurale, cum ar fi ganglionii rădăcinii dorsale. Azar, Y., Eyal-Giladi, H. (1979) *Marginal zone cells – the primitive streakinducing component of the primary hypoblast in the chick.* J. Embryol.

Exp. Morph. 52, 79 – 88 Azar, Y., Eyal-Giladi, H. (1981) *Interaction of epiblast and hypoblast in the formation of the primitive streak and the embryonic axis în chick, as revealed by hypoblast-rotation experiments.* J. Embryol. Exp. Morph. 61.

133 – 144 Bachiller, D., Klingensmith, J., Kemp, C, Belo, J.A.,

Anderson, R. M, May, S.

R., McMahon, J.A., McMahon, A.P., Harland, R.M., Rossant, J., De

Robertis, E.M. (2000) *The organizer factors Chordin and Noggin are requiredfor mouse forebrain development.* Nature 403, 658 – 661 Bally-Cuif, L., Wassef, M. (1994) *Ectopic induction and reorganization of Wnt-l expression in quail/chick chimeras.* Development 120, 3379 – 3394 Barnes, J.D., Crosby, J. L, Jones, C.M., Wright, C.V., Hogan, B.L. (1994)

Embryonic expression of Liml, the mouse homolog of Xenopus Xlim-l, suggests a role în lateral mezoderm differentiation and neurogenesis. Dev.

Biol. 161, 168 – 178 Beddington, R.S. (1994) *Induction of a second neural axis by the mouse node.*

Development 120 613 – 620 Beddington, R.S., Robertson, E. J. (1999) *Axis development and early asymmetry în mammals.* Cell 96, 195 – 209 Beddington, R.S.P., Smith, J.C. (1993) *Control of vertebrate gastrulation:*

Inducing signals and responding genes. Curr. Opin. Genet. Dev.3, 6 55

661 Belo, J.A., Bouwmeester, T., Leyns, L., Kertesz, N., Gallo, M., Follettie, M., De

Robertis, E.M. (1997) *Cerberus-like is a secretedfactor with neutralizing activity expressed in the anterior primitive nedoderm of the mouse gastrula.* Mech. Dev. 68, 45 – 57 „Blumberg, B., Bdiado Jr., J., Moreno, T.A., Kininer, C, Evans, R. M.

Papalopulu, N. (1997) *An essential role for retinoid siganling în anteroposterior neuralpatterning.* Development 124, 373 – 379

94

Studiu experimental în care se arată că receptorii acidului retinoic sunt esenţiali pentru diferenţierea neuronală şi specificarea caracterului posterior al neuroectodermului.

Bovolenta, P., Dodd, J. (1991) *Perturbation of neuronal differentiation and axon guidance in the spinal cord of mouse embryos lacking a floor plate: Analysis of Danforth's short tail mutation.* Development 113, 625 – 639

Brickman, J.M., Jones, C.M., Clements, M., Smith, J. C, Beddington, R.S.P. (2000) *Hex îs a transcripţional repressor that contributes to anterior identity and supresses Spemann organiser function.*

Development 127, 2303 – 2315

Briscoe, J., Sussel, L., Serup, D., Hartigan-o Conner, D., Jessel, T. M.

Rubenstein, J.L.R., Ericson, J. * (1999) *Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signaling.*

Nature, 398, 622 – 627 Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T.M., Ericson, J.A. (2000) *A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube.* Cell 101, 435 – 445 Bronner-Fraser, M. (1986) *Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using the monodonal antibody HNK-1.* Dev.

Biol. 115, 44 – 55

Bronner-Fraser, M., Fraser, S. (1989) *Developmental potenţial of avian trunk neural crest cells in situ.* Neuron 3, 755 – 766 Chalepakis, G., Fritsch, R., Fickensher, H., Deutsch, V., Goulding, M., Grüss, P.

(1991) *The molecular basis of the ondulated/Pax-l mutation.* Cell 66, 873

884

Chapman, K.M., Papaioannou, V.E. (1998) *Three neural tuhes în mouse embryos with mutations in the T-box gene Thx6.* Nature 391, 695 – 697 Chen, Y., Huang, L., Solursh, M. (1994) *A concentration gradient of retinoids in the early Xenopus laevis embryo.* Dev. Biol. 161, 70 – 76

Chiang, C, Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., Beachy, P.A. (1996) *Cyclopia and defective axial patterning în mice lacking Sonic hedgehog gene function.* Nature 383, 407 – 413 Conlon, R.A. (1995) *Retinoic acid and pattern formation in vertebrates.* Trends

Genet. 11, 314 – 319 Crossley, P.H., Martínez, S., Martin., G. R. (1996) *Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo.* Nature 380, 66 – 68

„Crossley, P.H., Martínez, S., Ohkubo, Yv, Rubenstein, J.L. R. (2001) *Coordinate expression of FGF8, OTX2, BMP4 and SHH in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic and optic vesicles.* Neuroscience 108, 183 – 206

Experimente de mare fineţe în care este identificată expresia *Fgf-8, Otx-2, BMP-4* şi *Shh* în timpul morfogenzei prozencefalului rostral (telencefal şi cupele optice) şi este discutată interacţiunea

inductoarea acestor molecule.

Currie, P.D., Ingham, P.W. (1996) *Induction of a specific muscle cell type by a hedgehog-likeprotein în zebrafish.* Nature 382, 452 – 455 95

D'Amico-Martel, A., Noden, D.M. (1983) *Contributions, of placodal and neural crest cells to avion cranial peripheral ganglia.* Am. J. Anat. 166, 445 – 468 Dale, J.K., Vesque, C, Lints, T.J., Sampath, T.K., Furley, A., Dodd, îi., Placzek.

M. (1997) *Cooperation of BMP7 and SHH in the induction offorebrain ventral midline cells by prechordal mezoderm.* Cell 90, 257 – 269 Dale, L., Howes, G., Price, B.M., Smith, J.C. (1992) *Bône morphogeneticprotein*

4: a ventralizing factor in early Xenopus development. Develqpment 115.

573 – 585 Davenne, M, Maconochie, M. K... Neun, R „Pattyn, A., Chambon, P., Krumlauf.

R.,} Rjjli, F: M.,<! ş\999)! Haxa2 and Hoxb2 control dorsoventmipattems of neuronal development in the rostră! hindbrain. Meuron, 4, 677 – 691 De Robertis, E/M. (1995) *Dismantling the organizer.* Nature 374, 407 – 408 Dias, M.S., Schoenwolf, G.C. (1990) *Formation of ectopic neuroepithelium în chick blastoderms: age related capacities for induction and selfdifferentiation following transplantation of quail Hensen's node.* Anat.

Rec. 229, 437 – 448 Dickinson, M.E., Krumlauf, R., McMahon, A.P. (1994) *Evidence for a mitogenic efect of Wnt-l in the developing mammalian central nervous sistem.*

Development 120, 1453 – 1471 Doe, C.Q., Technau, G.M. (1993) *Identification and cell lineage of individual neuralprecursors in the Drosophila CNS.* Trends Neurosci. 16, 510 – 514 Doniach, T. (1993) *Planar and vertical induction of anteroposterior pattern during the development of the amphibian central nervous sistem.* J. Neurobiol. 24.

2156 – 2176.

Downs, K.M., Davies, T. (1993) *Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope.* Development 118.

2155 – 1266 Edelman, G.M., Jones, F.S. (1993) *Outside and downstream of the homeobox.* J.

Biol. Chem. 268, 20683 – 20686 Edelman, G.M., Jones, F.S.

(1998) *Gene regulation of cell adhesion: a key step în neuralmorphogenesis.* Brain Res. Rev. 26, 337 – 352 Ekker, S. C, Ungar, A.R., von Greenstein, P.K.D., Porter, J.A., Moon, R. T.

Beachy, P.A. (1995) *Patterning activities of vertebrate hedgehog proteins in the developing eye and brain.* Curr. Biol. 5, 944 – 955 Evans, R.M. (1988) *The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.*

Science 240, 889 – 895 Eyal-Giladi, H., Wolk, M. (1970) *The inducing capacities of the primary hypoblast as revealed by transfilter induction studies.* Wilh. Roux Arch. Entw Mech.

Org. 165, 226 – 241 Feldman, B., Gates, M.A., Egan, E.S., Dougan, S.T., Rennebeck, G., Sirotkin, H.

I., Schier, A.F., Taâbot, W.S. (1998) *Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals.* Nature 395, 181 – 185. Ferreiro, B., Artinger, M., Cho, K., Niehrs, C. (1998) *Antimorphic goosecoids.*

Development 125, 1347 – 1359

Fietz, M.J., Concordet, J.P., Barbosa, R., Johnson, R., Krauss, S., McMahon, A.P., Tabin, C, Ingham, P.W. (1994) *The hedgehog gene family în Drosophila and vertebrate development.* Development [Suplim.] 120, 43 – 51

Figdor, M. C, Stern, C.D. (1993) *Segnmmtal organization of embryonic diencephalon.* Nature 363, 630 – 634

Finkelstein, R., Boncinelli, E. (1994) *Fromfly head to mammalian forehrain: the story ofotd and Otx.* Trends Genet. 10, 310 – 315

Finlay, B.L., Hersman, M.N., Darliiigton, R.B. (1998) *Patterns of vertebrate neurogemesis and the paths of vertebrate evolution.* Brain Behav. Evol. 52, 232 – 242

„Fântay, B.L., Darlington, R.B., Nicastro, N. (2001) *Developmental structure în brain evolution.* Brain. Behav. Sci. 24, 2

O prezentare detaliată a datelor şi modelelor care încearcă să exploreze evoluția creierului. Un bun text introductiv în neurobiologia evoluționistă.

Fishell, G., Mason, C.A., Hatten, M.E. (1993) *Dispersion of neural progenitors within the germinai zones of the forebrain,* Nature 362, 636 – 638

Foley, A. C, Storey, K.G., Stern, C.D. (1997) *The prechordal region lacks neural inducing ability, but con confer anterior character to more*

posterior neuroepithelium. Development 124, 2983 – 2996 Cercetarea arată că placa precordală nu are capacitatea de a semnaliza inducţia neurală pentru că nu poate redirecţiona celulele din epiblastul extraembrionar spre o soartă neurală. Ceea ce ar putea face placa precordală, după acest studiu, este de a conferi un caracter mai anterior celulelor din rombencefalul prospectiv.

Foley, A. C, Skromne, L, Stern, C.D. (2000) *Reconciling different models of forebrain induction and patterning: a dual role for the hypoblast.* Development 127, 3839 – 3854

Experimente în care s-a efectuat rotirea hipoblastului pentru a căpăta argumente prin care să se poată tranşa între modelul activării transformării al lui Niewkoop şi modelul celor doi organizatori, pentru cap şi pentru trunchi, propus de Spemann.

Fraser, S., Keynes, R., Lumsden, A. (1990) *Segmentation in the chick embryo hindbrain is definedby cell lineage restrictions.* Nature 344, 431 – 435

Frohman, M.A., Boyle, M., Martin, G. (1990) *Isolation of the mouse Hox-2.9 gene; analysis of embryonic expression suggests that positional information along the anterior-posterior axis is specified by mezoderm.* Development 110, 589 – 607

„Gale, E., Zile, M., Maden, M. (1999) *Hindbrain respecification in the retinoid-deficient quail.* Mech. Dev. 89, 43 – 54

Cercetare prin care se arată că fenotipul de embrion de prepeliţă obţinut prin deprivarea de vitamina A a mamelor, caracterizat de morfogeneza defectivă a rombencefalului, poate fi salvat printr-o singură injecţie de retânol.

Gallera, J. **(1971)** *Primary induction in birds.* Adv. Morphol. 9, 149 – 180

„Garda, A.L., Echévarria, D., Martínez, S. (2001) *Neuroepithelial co-expression of Gbx2 and Otx2 precedes Fgf8 expression in the isthmic organizer.* Mech. Dev. 101, 111 – 118

Experimente foarte elegante în care este descrisă expresia reglată temporal a triadei *Gbx-2, Otx-2, Fgf-S.* Prezenţa într-un anumit interval de dezvoltare atât a expresiei *Otx-2,* cât şi a *Gbx-2* în aceleaşi celule sugerează că aceşti doi factori de transcripţie nu sunt antagonici.

Gavalas, A., Davenne, M., Lumsden, A., Chambon, P., Rijli, F. M.

(1997) *Role of Hoxa2 în axon pathfinding and rostral hindbrain patterning.* Development 124, 3693 – 3702

„Glover, J. C, (2000) *Development of specific connectivity between premotor neurons and motoneurons in the brain stern and spinal cord:* Physiol. Rev. 80, 615 – 647

O sinteză comprehensivă despre morfogeneza şi regionalizarea măduvei spinării şi trunchiului cerebral, în care sunt abordate mecanismele inductive care controlează localizarea şi diferenţierea motoneuronilor şi neuronilor senzitivi, mecanismele de chemoghidare care controlează proiectarea corectă a axonilor şi sunt analizate contribuţiile activităţii electrice *vs* adeziune celulară în precizia cu care se stabilesc sinapse în timpul dezvoltării măduvei spinării şi trunchiului cerebral.

Graham., A., Beghie, J. (2000) *Neurogenic placodes: A common front.* Trends Neurosci. 23, 313 – 316

„Grapin-Botton, A., Bonnin, M-A., McNaughton, L.A., Krumlauf, R., Le Douarin, N. M (1995) *Plasticity of transposed rhombomeres: Hox gene induction is correlated with phenotypic modifications.* Development 121, 2707 – 2721

Prin transplantarea unor porţiuni de istmus la diferite niveluri ale tubului neural, se arată că semnalizarea istmică este dezactivată sau rescrisă la nivelul măduvei spinării.

Greco, T.L., Takada, M.M., Newhouse, J.A., McMahon, A.P., Camper, S.A. (1996) *Analysis of the vestigial tail mutation demonstrates that Wnt-3 a gene dosage regulates mouse axial development.* Genes & Dev. 10, 313 – 324

Hall, A. (1998) *Rho GTP – ases and the actin cytoskeleton.* Science 279, 509 – 514

Hamburger, V., Hamilton, H.L. (1951) *A series of normal stages in the development of the chick embryo.* J. Morph. 88, 49 – 92 (Retipărit în: Dev. Dyn. 195, 231 – 2721992). /.

Standardizarea stadiilor de dezvoltare normală la embrionul de găină.

Hamilton, W.J., Boyd, J.D., Mossman, H.W. (1962) *Human Embryology: Prenatal Development of Form and Function* (Ed. a 3-a). Williams & Wilkins, Baltimore

Hara, K... (1978) Spemann's organizer în birds. În: Nakamura, O., Toivonen, S. (Eds.): *Organizer – A milestone of a half-century from*

Spemann (pp. 221 – 265). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam

Hemmati-Brinvalou, A., Kelly, O.G., Melton, D.A. (1994) *Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays*;...*directneuralizing getivity. Ce*\\ *77, 283 – 295*... – „—". f

Hidalgo-Sanchez, M., Simeone, A., Alvârado-malâart, R.M. (1999) *Fgf8 and Gbx2 induction concomitent with Otx2 repression is correlated with the*

midbrain-hindbrain fote of caudal prosencephalon. Development 126.

3191 – 3202 Hill, C.S., Wynne, J., Treisman, R. (1995) *The Rhofamily GTP – ases RhoA, Raci, and CDC42 Hs regulate transcripţional activation by SRF.* Cell 81, 1159

1170 Holley, S.A., Ferguson, E.L. (1997) *Fish are likeflies are like frogs but different from chickens: conservation of dorso-ventral patterning mechanisms.*

Bioessays 19, 281 – 284 Holst B.D., Wang, Y" Jones, F.S., Edelman, G.M. (1997) *A binding site for Pax proteins regulates expression of the gene for the neural cell adhesion molecule in the embryonic spinal cord.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 94.

1465 – 1470

Molecula neuronală de adeziune celulară N-CAM prezintă domenii de cuplare pentru factori de transcripţie cu domeniu pereche, cum ar fi *Pax-6.* Reglarea de către aceşti factori de transcripţie prin intermediul acestui domeniu este esenţială pentru expresia moleculei de adeziune. Holtfreter, J. (1933) *Eigenschaften und Verbreitung incluzierender Stoffe.*

Naturwiss. 21, 766 – 770 Holtfreter, J. (1934) *Der Einfluss thermischer, mechanischer und chemischer*

Eingreffe aufdie Incluzierungsfähigkeit von Triton-Keimteilen. Wilh. Roux

Arch. Entwicklungsmech.org. 132, 225 – 306 Holtfreter, J. (1936) *Regionale Induktionen în xenoplastisch zusammengesetzen*

Explantaten. Wilh. Roux Arch. Entw Mech.org. 134, 466 – 550 Holtfreter, J. (1939) *Differenzierungspotenzen isolierter Teile der*

Urodelengastrula. Wilh. Roux Arch. Entw Mech.org. 138, 522 –

656 Houchtnandzadeh, B., Wieschaus, E., Leibler, S. (2002) *Establishment of developmentalprecision andproportions in the early Drosophila embryo.*

Nature 415, 798 – 802 Inoue, T., Nakamura, S., Osumi, N (2001) *Current topics în comparative developmental biology of vertebrate brains.* Neuroscience Res. 39, 371

376 Izpisua-Belmonte, J. C, De Robertis, E.M., Storey, K.G., Stern, C.D. (1993) *The homeobox gene goosecoid and the origin of organizer cells in the early chick blastoderm.* Cell 74, 645 – 659 Irving, C, Mason, I. (1999) *Regeneration ofisthmic tissue is the result of a specific and direct interaction between rhombomere 1 and midbrain.* Development

126, 3981 – 3989 „Irving, C, Mason, I. (2000) *Signalling by FGF8 from the isthmus patterns anterior hindbrain and establishes the anterior Urnit of Hox gene expression.* Development 127, 177 – 186

Rezultate experimentale foarte clare prin care se arată că rombomerul 1 poate exprima gene *Hox,* dar că expresia acestora este reprimată de FGF8, de la nivelul organizatorului istmic. Este propus un model după care semnalizarea FGF8 este: limitată de un gradient posterior de acid retinoic.

99

Jerison, H.J. (1991) *Brain size and the evolution ofmind.* The 59* James Arthur

Lecture on the evolution of the Human Brain. American Museum of

Natural History, New York Jessell, T.M. (2000) *Neuronal specification in the spinal cord: Inductive signals and transcripţional codes.* Nat. Rev. Genet. 1, 20 – 29 Jones, F.S., Holst, B.D., Mânowa, O., DeRobertis, E.M., Edelman, G.M. (1993)

Binding and transcripţional activation of the promoter for the neural cell adhesion molecule by Hoxl6 (Hox 3.3). Porc. Natl. Acad. Sci. USA 90.

6557 – 6561 Jones, F. SL, Prediger, E.A., Bittner, D.A., DeRobertis, E.M., Edelman, G. M.

(1992) *Cell adhesion molecules as tragetsfor hox genes: N-CAM promoter activity is modulated by co-transfection with Hox 2.5 and 2.4.* Porc. Natl.

Acad. Sci. USA 89.2086 – 2090 Kallunki, P., Edelman, G.M., Jones, F.S. (1997) *Tissue-specific expression of the*

Îl cell adhesion molecule is modulated by the neural restrictive silencer element. J. Cell. Biol. 138, 1343 – 1354 Kallunki, P., Edelman, G.M., Jones, F.S. (1998) *The neural restrictive silencer element con act as both a repressor and enhancer of îl cell adhesion molecule gene expression duringpostnatal development.* Porc. Natl. Acad.

Sci. USA 95, 3233 – 3238 Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. (1995) *Nonsteroid nuclear receptors: what are the genetic studies telling us about their role în real life?* Celî 83, 859 – 869 „Khaner, O. (1995) *The rotated hypoblast of the chicken embryo does not inițiate an ectopic axis in the epiblast.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 92.10733

10737

Replici ale experimentelor clasice ale lui Azar şi Eyal-Giladi în care se investighează dacă polaritatea hipoblastului este superioară celei a epiblastului şi stabileşte axa embrionară. Rezultatele nu susțin dominanța hipoblastului asupra epiblastului. „Kiecker, C, Niehrs, C. (2001) *The role of prechordal mesendoderm în neural patterning.* Curr. Neurobiol. 11, 27 – 33

Cea mai recentă sinteză asupra rolului plăcii precordale în inducția neurală. Krumlauf, R. (1994) *Hox genes în vertebrate development.* Cell 78, 191 – 201 Kuhlenbeck, H. (1973) *The Central Nervous Sistem of Vertebrates* (voi. 3). S.

Karger A.G., Berlin Lance-Jones, C, Landmesser, L. (1980) *Motoneurone projection patterns in the chick fund limb following early parțial revearsals of the spinal cord.* J.

Physiol. (London) 302, 581 – 602 Latinkik, B.V., Smith, J. C. (1999) *Goosecoid and mix. J repress Brachyury expression and are required for headformation in Xenopus.* Development

126, 1769 – 1779 Le Douarin, N. (1974) *Cell recognition based on natural morphological nuclear markers.* Med. Biol. 52, 281 – 319 Lemaire, L. Roesser, T., Izpisua-Belmonte, J. C, Kessel, M. (1997) *Segregating expression domains of two goosecoid genes during the transition from*

gastrulation to neurulation in chick embryos. Development 124, 1443

1452 Liem, K.F. Jr., Tremml, G., Roelink, H, Jessell, T.M. (1995) *Dorsal dijferentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epiderma! ectoderm* Cell 82, 969 – 979 Lillie, F.R. (1952)

Development of the chick. În: Willier, B.H. (Ed.): *Lillie's*

Development of the Chick (pp. 92 – 124). Henry Holt and Co., Inc., New

York Linney, E., LaMantia, A.S. (1994) *Retinoid signaling în mouse embryos.* Adv.

Dev. Biol. 3, 73 – 114 Little, E.B., Crossin, K.L., Krushel, L.A., Edelman, G.M., Cunningham, B. A.

(2001) *A short segment within the cytoplasmic domain of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) is essential for N-CAM-induced NF-ks*

activity în astrocytes. Porc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 2238 – 2243 „Liu, J.P., Jessell, T.M. (1999) *A role for rhob in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural tube.* Development 125, 5055 – 5067

Semnalizarea BMP este implicată în delaminarea celulelor crestelor neurale de la nivelul tubului neural dorsal prin activarea genei care codează molecula Rho-B. Lumsden, A., Krumlauf, R. (1996) *Patterning the vertebrate neuraxis.* Science

274, 1109 – 1115 Lun, K., Brand, M. (1998) *A series of no isthmus (noi) alleles of the zebrafish pax2.1 gene reveals multiple signaling events în development of the midbrain-hindbrain boundary.* Development 125, 3049 – 3062 Maden, M., Gale, E., Kostetskii, I., Zile, M. (1996) *Vitamin a-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects.* Curr. Biol. 6, 417

426 Mangold, O. (1929) *Experimente zur Analyse der Determination und Induktion der*

Medullarplate. Wilh. Roux Arch. Entw Mech.org. 117, 586 – 696 Mangold, O. (1931) *Das Determinierungsproblem. III. Das Wilbertierauge in der*

Enwicklung und Regeneration. Ergebn. Biol. 7, 193 – 403 Mangelsdorf, D.J., Urnesono, K., Evans, R.M. (1994) The retinoid receptors. În:

Sporn, M.B., Roberts, A.B., Goodman, D.S. (Eds.): *The Retinoids:*

Biology, Chemistry and Medicine (Ed. a II-a; pp. 319 – 349). Raven, New

York Mauro, V.P., Wood, I. C, Krushel, L., Crossin, K.L., Edelman, G.M. (1994)

Cell adhesion alters gene transcription in chicken embryo brain

cells and mouse embryonal carcinoma cells. Porc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2868

2872 Margo, V., Davey, R.A., Zuo, Y., Cunningham, J.M., Tabin, C.J. (1996)

Biochemical evidence that Patched id the hedgehog receptor. Nature 384.

176 – 179 Martínez, S., Simeone, A. (1999) Specification and patterning of the rostral neural tube. În: di Porzio, U., Pernas-Alonso, R., Perrone-Capano, C. (Eds.):

Develomental of Dopaminergic Neurons (voi. 4). R.G. Landes Co., Austin

101

„Martínez, S., Crossley, P.H., Cobos, I., Rubenstein, J.L.R., Martin, G. R.

(1999) *FGF8 induces formation of an ectopic organizer and isthmocerebellar development via a repressive efect on Otx2 expression.*

Development 126, 1189 – 1200

Experimente spectaculoase în care paturi de FGF8 plasate ectopic induc formarea unor vezicule similare unor tectumuri optice aşezate în oglindă şi, lateral, a unei vezicule cu aspect de primordiu cerebelos. Martinez-Barbera, J.P., Signore, M., Boyl, P.P., Puelles, E., Acampora, D., Gogoi.

R., Schubert, F., Lumsden, A., Simeone, A. (2001) *Regionalization of anterior neuroectoderm and its competence în responding to forebrain and midbrain inducing activities depend on mutual antagonism between OTX2*

and GBX2. Development 128, 4789 – 4800

Confirmarea rolului *Otx-2* şi *Gbx-2* în morfogeneza segmentelor de neuroectoderm anterioare şi posterioare faţă de organizatorul istmic. Masetto, S., Perin, P., Malusă, A., Zucca, G., Valii, P. (2000) *Membraneproperties of chick semicircular canal hair cells in situ during embryonic development.* J. Neurophysiol. 83, 2740 – 2756 Matise, M.P., Lance-Jones, C. (1996) *A criticai period for the specification of motor pools in the chick lumbosacral spinal cord.* Development 122, 659

669 Matsuo, L, Kuratani, S., Kimura, C, Takeda, N., Aizawa, S. (1995) *Mouse Otx2*

functions in the formation and patterning of the rostral head. Genes &

Dev. 9, 2646 – 2658 McMahon, A.P. (2000) *Neural patterning: The role of Nkx genes in the ventral spinal cord.* Genes Dev. 14, 2261 – 2264 Meech, R., Kallunki, P., Edelman, G.M., Jones, F.S. (1999) *A binding site for homeodomain and Paxproteins is necessary for îl cell adhesion molecule gene expression by Pax-6 and bone morphogenetic proteins.* Porc. Natl.

Acad. Sci. USA 96, 2420 – 2425 „Miao, N., Wang, M., Ott, J.A., D'Alessandro, J.S., Woolf, T.M., Bumerot, D.

A., Mahanthappa, N.K., Pang, K. (1997) *Sonic hedgehog promotes the survival of specific CNS neuron populations and protects these cells from toxic insult in vitro.* J. Neurosci. 17, 5891 – 5899

Expresia *Shh* are rol trofic pentru neuronii dopaminergici şi GABA-ergici în cultură şi promovează supravieţuirea acestora. Este analizat rolul SHH ca agent terapeutic în boli degenerative, cum ar fi boala Parkinson. Millet, S., Campbell, K., Epstein, D., Losos, K., Harris, E., Joyner, A. (1999) *A*

role for Gbx2 în repression of Otx2 and positioning the mici/hindbrain organizer. Nature 401, 161 – 164 Mitrani, E., Eyal-Giladi, H. (1981) *Hypoblastic cells canform a disk inducing an embryonic axis in the chick epiblast.* Nature 289, 800 – 802 Mitrani, E., Shimoni, Y., Eyal-Giladi, H. (1983) *Nature of the hypoblastic influence on the chick embryo epiblast.* J. Embryol. Exp. Morph. 75, 21 – 30

102

Mohler, J., Vani, K. (1992) *Molecular organization and embryonic expression of the hedgehog gene involved în cell-cell communication in segmentai patterning of Drosophila.* Development 115, 957 – 971 Moury, J.D., Jacobson, A.G. (1989) *Neural fold formation at newly created boundaries between neural plate and epidermis in the axototl.* Dev. Biol.

133, 44 – 57

Müller, F., Albert, S., Blader, P, Fischer, N, Hallonet, M., Strähle, U. (2000) *Direct action of the Nodal-related signal Cyclops în induction of sonic hedgehog in the ventral midline of the CNS.* Development 127, 3889 – 3897

Nagai, T., Aruga, J., Minowa, O., Sugimoto, T., Ohno, Y., Noda, T., Mikoshiba, K. (2000) *Zic2 regulates the kinetics ofneurulation.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 1618 – 1623

Experimente care arată că *Zic-2* controlează viteza cu care se

produce neurulaţia. La homozigoţii *Zic-2* deficienţi, neurulaţia nu se produce şi apar defecte de morfogeneză la nivelul măduvei spinării.

Nakamura, H., Nakano, K.E., Igawa, H.H., Takagi, S., Fujisawa, H. (1986) *Plasticity and rigidity of differentiation ofbrain vesicles studied în quail-chickehimeras.* Cell. Diff. 19, 187 – 193

Nakamura, H., Takagi, S., Tsuji, T., Matsui, K.A., Fusisawa, H. (1988) *The prosencephalon has the capacity to differenţiate into the optic tectum: analysis în quail-chick-chimer ic brain.* Dev. Growth Diff. 30, 2723 – 2730 Nakata, K., Nagai, T., Aruga, J., Mikoshiba, K. (1997). *Xenopus Zic3, a primary regulator both în neural and neural crest development.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 11980 – 11985

Nauta, W.J.H., Feirtag, M. (1986) *Fundamental neuroanatomy.* W.H. Freeman and Co., New York

Niehrs, C, Keller, R., Cho, K.W. Y, De Robertis, E.M. (1993) *The homeobox gene goosecoid controls cell migration in Xenopus embryos.* Cel! 72, 491 – 503

Niewkoop, P.D., Botterenbrood, E. C, Kremer, A., Bloesma, F.F. S.N., Hoessels, E.L. M.J., Meyer, G., Verheyen, F.J. (1952) *Activation and organization of the Central Nervous Sistem în Amphibians. J.* Exp. Zool. 120, 1-108 Niewkoop, P.D., Nigtevecht, G.V. (1954) *Neural activation and trasnformation in explants of competent ectoderm under the influence of fragments of anterior norochord în urodeles.* J. Embryol. Exp. Morph. 2, 175 – 193 Nieuwkoop, T., Johnen, A.G., Albers, B. (1985) *The epigenetic Nature of Early Chordate Development. Inductive Interactions and Competence.* Oxford University Press, Oxford

Northcutt, R.G., Barlow, R. (1998) *Amphibians provide new insights into taste-bud development.* Trends Neurosci. 21, 38 – 43

Northcutt, R.G. (2001) *Changing views ofbrain evolution.* Brain Res. Bull. 55, 6, 663 – 674

„Obst-Pernberg, K., Medina, L., Redies, C. (2001) *Expression of R-cadherin and N-cadherin by cell groups and fiber tracts in the developing mouse*

103

forebrain: Relation io the fonuation of funcţional circuits. Neuroscience

106, 505 – 533

Studiu în care se arată că expresia Rei N-caderinelor este specifică şi poate discrimina între unele zone şi straturi corticale şi,

respectiv, circuite nervoase. Odenthal, J., Haffier, P., Vogelsang, E., Brand, M., van Eeden, F.J.M., Furutani-Seiki, M., Granato, M „Hammerschmidt, M., Heisenberg, C.P., Jiang, Y.

J., Kane, D.A., Kelsh, R.N., Mullins, M. C, Warga, R.M., Allende, M.

L., Wekherg, E.S., Niisslein-Volhard, C. (1996) *Mutations affecting the formatiom of the norochord in the zebrafish, Danio reno.* Development

123, 103 – 115

Monitorizarea mutaţiilor care afectează morfogeneza norocordului. Olteanu, A., Lupii, V. (2000) *Neurofiziologia sistemelor senzitivo-senzoriale.* Presa

Universitară Clujeană, Cluj-Napoca Olteanu, A., Lupu, V., Miu, A. (2001) *Neurofiziologia comportamentului uman.*

Presa Universitară Clujeană, Cluj-Napoca

Õrr, X. (1887) *Contribution to the embriology of the lizard.* J. Morph. 1, 311 – 372 Papalopulu, N., Kininer, C. (1996) *A posteriorizing factor, retinoic acid, reveals that anteroposterior patterning controls the timing of neuronal differenciation inXenopus neuroectoderm.* Development 122, 3409 – 3418 „Papilian, V., Preda, V. (1946) *Embriologie.* E. Welther, Sibiu

O excelentă introducere în embriologia clasică. Pera, E.M., Kessel, M. (1997) *Patterning of the chick forebrain anlage by the prechordal plate.* Development 124, 4153 – 4162

Experimente care susţin competenţa inductoare a plăcii precordale asupra neuroectodermului. Peters, P.W.J., Dormans, J.A. M.A., Geelen, J.A.G. (1979) *Light microscopic and ultrastructural observations in advanced stages of inducea exencephaly and spina bifida.* Teratology 19, 183 Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B., De Robertis, E. M. (1996) *Dorsoventralpatterning în*

Xenopus: Inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to

BMP-4. Cell 86, 589 – 598 Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bowmeester, T., De

Robertis, E.M. (1999) *The head inducer Cerberus is a multifuncţional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals.* Nature 397, 707 – 710 Placzek, M., Tessier-Lavigne, M., Yamada, T „Jessell, T.M., Dodd, J. (1990)

Mezodermal control of neural cell identity: floor plate induction

by the norochord. Science 250, 985 – 988 „Placzek, M., Jessell, T.M., Dodd, J. (1993) *Induction of floor plate differentiation by contact-dependent, homeogenetic signals.* Development

117, 205 – 218

Semnale dependente de contactul dintre norocord şi celulele din neuroectodermul ventral sunt necesare pentru inducerea plăcii podelei la nivelul măduvei spinării prospective.

104

Prince. V., Lumsden, A. (1994) *Hoxa-2 expression in normal and transposed rhombomeres: independent regulation in the neural tube and neural crest.*

Development 120, 911 – 923 Puelles, E., Rubenstein, J.L.R., Puelles, L. (2001) *Chicken Nkx6.1 expression al advanced stages of development identifies distinct brain nudei derived from the bas al plate.* Mech. Dev. 102, 279 – 282 Puelles, L. (1995) *A segmentai morphological paradigm for underslanding vertebrate for ebrains.* Brain. Behav. Evol. 46, 319 – 337 Puelles, L. (2001) *Brain segmentation and forebrain development în amniotes.*

Brain Res. Bull. 55, 6, 695 – 710 „Puelles, L., Rubenstein, J.L. R. (1993) *Expresion patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization.* Trends Neurosci. 16, 472 – 479

Una din primele integrări ale datelor experimentale care susţin modelul prozomeric. Puelles L., Kuwana E., Puelles E., Bulfone A., Shimamura K., Keleher J., Smiga

S., Rubenstein J.L.R. (2000) *Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes Dlx-2, Emx-l, Nkx2.1, Pax6, and Thr-l.* J Comp Neurol 424, 409

438 Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C, LaMantia, A. S.

McNamara, J.O., Williams, SM. (2001) *Neuroscience.* Sinauer.

Massachusetts Ranscht, B. (2000) *Cadherins: molecular codes for axon guidance and synapse formation.* Int. J. Devi. Neuroscience 18, 643 – 651 Reader, S.M., Laland, K.N. (2002) *Social intelligence, inovation, and enhanced brain size imprimates.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 4436 – 4441 „Redies, C. (2000) *Cadherins in the central nervous sistem.* Prog. Neurobiol. 61.

611 – 648

O prezentare detaliată şi comprehensivă a caracteristicilor moleculare ale căderinelor clasice şi a expresiei acestora în tubul neural. Redies, C, Ast, M., Nakagawa, S., Takeichi, M., Martinez-de-la-Torre, M.

Puelles, L. (2000). *Morphologic fate of diencephalic prosomeres and their subdivisions revealed by mapping cadherin expression.* J. Comp. Neurol.

421, 481 – 514 „Reiner, A., Medina, L., Veenman, C.L. (1998) *Structural and functional evolution of the basal ganglia în vertebrates.* Brain Res. Rev. 28, 235 – 285

O sinteză extinsă a organizării funcţionale a ganglionilor bazali la vertebrate, cu analiza identităţii histochimice a populaţiilor de neuroni, clasificarea diviziunilor şi circuitelor funcţionale şi discutarea evoluţiei acestei structuri. Riiinn, M., Dierich, A., Shawlot, W., Behringer, R.R., Le Meur, M, Ang, S. L.

(1998) *Sequential roleşfor Otx2 în visceral endoderm and neuroectoderm for forebrain and midbrain induction and specification.* Development 125.

845 – 856

105

Acest studiu demonstrează transcrierea în doi timpi a *Otx-2,* mai întâi în endodermul visceral, cu rol în inducţia neurală şi, apoi, în neuroectoderm, pentru specificarea domeniilor prozencefalului şi mezencefalului. Rhinn, M., Brand, M. (2001) *The midbrain-hindbrain boundary organizer.* Curr.

Opin. Neurobiol. 11, 34 – 42

O prezentare concisă a semnalizării organizatorului istmic. Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Kortzh, V., Norlin, S., i Altaba, R.

Tanabe, Y., Placzek, M., Edlund, T., Jessell, T. M, Dodd, J. (1994) *Floor plate and motor neuron induction by vhh-l, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the norochord.* Cell 76, 761 – 775 Ronshaugen, M., McGinnis, N., McGinnis, W. (2002) *Hox protein mutation and macroevolution of the insect body plan.* Nature 415, 914 – 917 Roux, W. (1895) *The problems, method, and scope of developmental mechanics.*

Wood's Hole Biol. Lect. 149 – 190 „Rubenstein, J.L.R.,

Shimamura, K., Martínez, S., Puelles, L. (1998)

Regionalization of the prosencephalic neural plate. Annu. Rev. Neurosci.

21, 445 – 478

O foarte bună sinteză a studiilor care au descris hărţile genealogice celulare

(fatemaps) ale prozencefalului, precum şi a cercetărilor genetice şi de embriologie experimentală în legătură cu regionalizarea plăcii neurale corespunzătoare prozencefalului prospectiv. Rubenstein, J.L.R., Martínez, S., Shimamura, K., Puelles, L. (1994) *The prosomeric model: proposal for the organization of the embryonic forebrain.* Science 266, 578 – 560 Rugh, R., Grupp, E. (1960) *Congenital defects following low level x-irradiation.*

Anat. Rec. 138, 380 Ruizi Altaba, A. (1993) *Induction and axial patterning of the neural plate: planar and vertical signals.* J. Neurobiol. 24, 1276 – 1304 Qiu, M., Shimamura, K., Sussel, L., Chen, S., Rubenstein, J.L.R. (1998) *Control of anteroposterior and dorsoventral domains of Nkx-6.1 gene expression in relation to other Nkx genes during vertebrate CNS development.* Mech.

Dev. 72, 77 – 88 Sadler, T.W. (1990) *Langman's Medical embriology.* Williams & Wilkins.

Baltimore Sander, M., Paydar, S., Ericson, J., Briscoe, J., German, M., Jessel, T. M.

Rubenstein, J. (2000) *Ventral neural patterning by Nkx homeobox genes:*

Nkxǎ. l controls somatic motor neuron and ventral interneurons fates.

Genes Dev. 14, 2134 – 2139 Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L.K., De Robertis, E. M.

(1994) *Xenopus chordin: a novei organizing factor activated by organizer specific homeobox genes.* Cell 79, 779 – 790 Saxen, L., Toivonen, S. (1962) *Primary Embryonic Induction.* Academic Press.

Londra Spemann, H. (1938) *Embryonic Development and Induction.* Yale University

Press, New Haven

106

Schardein, J.L. (1993) *Chemically induced birth defects.* Ed. a II-a, Marcel

Dekker, New York Schmid, A., Chiba, A., Doe, C.Q. (1999) *Clonal analysis of Drosophila embryonic neuroblasts: Neural cell types, axon projections and muscle targets.*

Development 126, 4653 – 4689 Seifert, R., Jacob, M., Jacob, H. J. (1993) *The avian prechordal head region: a morphological study.* J. Anat. 183, 75 – 89 „Selleck, M.A., Bronner-Fraser, M. (1996) *The genesis of avian neural crest cells: A classic embryonic induction.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 9352

9357

Sinteză în care este discutate probele care susţin faptul că celulele crestelor neurale nu sunt o populaţie distinctă, ci fac parte dintr-o populaţie de progenitori pluripotenţiali de la nivelul tubului neural dorsal. Shanmugalingam, S., Houart, C, Picker, A. Reifers, F., MacDonald, R., Barth, A.

K., Brand, M., Wilson, S… W. (2000) *Ace/FGF8 is requiredfor forebrain commissure formation and patterning of the telencephalon.* Development

127, 2549 – 2561 Shawlot, W., Deng, J.M., Behringer, R.R. (1998) *Expression of the mouse cerberus-related gene, Cerr 1, suggests a role în anterior neural induction andsomitogenesis.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 6198 – 6203 „Shimamura, K., Hartigan, D.J., Martínez, S., Puelles, L., Rubenstein, J.L. R.

(1995) *Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube.* Development 121, 3923 – 3933

Sinteză despre discriminarea moleculară a domeniilor longitudinale care se întind de la prozencefal până la măduva spinării. Se prezintă o re interpretare a concepţiei columnare a morfogenezei tubului neural în lumina datelor moleculare şi sunt trecute în revistă referinţele cheie care susţin regibnalizarea tubului neural după domenii longitudinale *şi* transversale (neuromere). Shimamura, K., Rubenstein, J.L.R. (1997) *Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain.* Development 124, 2709 – 2718 „Simeone, A. (1998) *Otxl and Otx2 in the development and evolution of the mammalian brain.* EMBO J. 17, 6790 – 6798

O excelentă sinteză care prezintă expresia şi rolurile funcţionale ale genelor *Otx* în morfogeneza şi regionalizarea plăcii şi tubului neural. Simeone, A., Acampora, D., Mallajnaci, A., Stornaiuolo, A., D'Apice, M. R.

Nigro, V., Boncinelli, E. (1993) *A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo.* EMBO J. 12, 2735 – 2747 Sive, H.L., Draper, B.W., Harland, R., Weintraub, H. (1990) *Identification of retinoic acid-sensitive period during primary axis formation in Xenopus laevis.* Genes Dev. 4, 932 – 942 Smith, J.C. (1993) *Dorso-ventralpatterning in the neural tube.* Curr. Biol. 3, 582

585 Smith, J. (1999) *T-box genes: What they de and how they do it.* Trends Genet. 15.

154 – 158

107

Smith, J.L., Schoenwolf, G.C. (1989) *Norochordal induction of cell wedging in the chick neural plate and its role în neural tube formation.* J. Exp. Zool. 250, 49 – 62

Smith, W. C… Harland, S.M. *(\W1) Enpre Asicm doning of noggin, a new dorsalizing factor localizând to the Spemann organizer în Xenopus embryos.* Cell 70, 829 – 840

Smith, W. C, Knecht, A, K., Wu, M., Harland, R.M. (1993) *Secreted noggin protein mimics the Spemann organiser în dorsalizing Xenopus mezoderm.*

Nature 361, 547 – 549 „Smith Fernandez, A., Preau, C, Reperant, J., Boncinelli, E., Wassef, M. (1998)

Expression of the emx-l and Dlx-l homeobox genes define ihree… – molecularly distinct domaihs in the telencephalon of mouse, chick, turile and frog embryos: Implications for the evolution of telencephalic;.).: subdivisions în amniotes. Development 125, 1099 – 2111

Prin analiza expresiei *Emx-l* şi *Dlx-l* se arată că există trei domenii omoloage în prozencefalu! de la embrionii de şoarece, găină, broscă şi broască ţestoasă, denumite domenii palial, intermediar şi striat (a se înţelege: în legătură cu striatumul).

Spemann, H. (1935) *The organizer efect în embryonic development.* Physiol. Med. (Prelegere Nobel)

Spemann, H. (1938) *Embryonic Development and Induction.* Yale University

Press, New Haven

Spemann, H., Mangold, H. (1924) *Ober die Induktion von Embryoanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren.* Wilh.

Roux Arch. Entw Mech.org., 117, 586 – 696

Stark, M.R., Sechrist, J., Bronner-Fraser, M., Marcelle, C. (1997) *Neural tube-ectoderm interaction are required for frigeminal placode formation.* Development 124, 4287 – 4295 Stein, S., Kessel, M. (1995) *A homeobox gene involved în node, norochord and neural plate formation of chick embryos.* Mech. Dev. 49, 37 – 48 Stein, S., NIB, K., Kessel, M. (1996) *Differenţial activation of the clusiered homeobox genes CNOT2 and CNOT1 during notogenesis in the chick.* Dev. Biol. 180, 519 – 533

Stone, D.M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T.A., Cu, Q., Johnson, R.L., Scott, M.P., Hooper, J.E., Sauvage, F.D., Rosenthal, A. (1996) *The tumor-supressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog.* Nature 384, 129 – 134

Storey, K.G., Crossley, J. M, De Robertis, E. M, Norris, W.E., Stern, C.D. (1992) *Neural induction and regionalisation in the chick embryo.* Development 114, 729 – 741

Stoykova, A., Gotz, M., Grüss, P., Price, J. (1997) *Pax6-dependent. regulation of adhesive patterning, R-cadherin expression and boundary formation in developingforebrain.* Development 124, 3765 – 3777

La fenotipul *ochi mici (Small eye),* expresiile moleculelor PAX-6 şi R-caderinei sunt alterate, ceea ce corelează cu nediferenţierea domeniilor palliumului şi

striatumului. Aceste date sugerează o relaţie între factorul de transcripţie *Pax-6* şi controlul expresiei moleculei de adeziune R-caderină.

Strähle, U., Blader, P., Ingham, P.W. (1996) *Expression of axial and sonrc hedgehog în wildiype and midline defective zebrafish embryos.* Int. J. Dev. Biol. 40, 929 – 940

„Streit, A., Lee, J.K., Woo, L, Roberts, C, Jesseli, T, M" Stern, C. D. (1998) *Chordin regulates primitive streak development and the stability of induced neural cells, but is not suficient for neural induction in the chick embryo.* Development 125, 507 – 519

Studiu în care se demonstrează că molecula cordină joacă un rol în inducţia neurală prin antagonizarea semnalizării BMP, dar nu este suficientă pentru inducţia neurală. Cordina poate stabiliza expresia unor markeri neuronali exprimaţi timpuriu în celule care au început deja să se diferenţieze în neuroni. Taira, M., Saint-Jeannet, J.P., Dawid, I.B. (1997) *Role of Xlim-l and Xbra genes în anteroposterior patterning*

of neural tissue by the head and trunk organizer, Porc. Nati. Acad. Sci. USA 94, 895 – 900

Takada, S., Stark, K.L., Shea, M.J., Vassileva, G., McMahon, J.A., McMahon, A.P. (1994) *Wnt-Sa regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo.* Genes Dev. 8, 174 – 189

Takaya, H. (1978) Dynamics of the organizer. A. Morphogenetic movements ana specificities în induction and differentiation of the organizer. În: Nakamura, O., Toivonen, S. (Eds.): *Organizer – A milestone of a half-century from Spemann* (pp. 221 – 265). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam

Talbot, W.S., Trevarrow, B., Halpern, M.E., Melby, A.E., Farr, G" Posâiethwait, J. R, Jowett, T., Kimmel, K.B., Kimeiman, D. (1995) *The organizer-specific homeobox gene floating-head is essential for norochord development in the zebrafish.* Nature 378, 150 – 157

Tam, P.P.K. (1999) *Anterior patterning by synergistic activity of the early gastrula organizer and the anterior germ layer tissues of the mouse embryo.* Development 126, 5171 – 5179

Tam, P.P.L., Steiner, K. A.", Zhou, S.X., Quinlan, G.A. (1997) *Lineage and functional analyses of the mouse organizer.* Cold Spring Harbor Symp. Quant: Biol. 62, 135 – 144 Tanabe, Y., Roelink, H., Jesseli, T.M. (1995) *Induction of motor neurons by sanie hedgehog is idependent of floor plate.* Curr. Biol. 5, 651 – 658 „Teillet, M.A., Lapointe, F., Le Douarin, N – M. (1998) *The relationship between norochord and floor plate în vertebrate development revisited.* Porc. Nati. Acad. Sci. USA 95, 11733 – 11738

Studiu-cheie în care se arată că formarea plăcii podelei nu se produce prin inducţie, ci prin inserţia unei populaţii de celule provenite dintr-o populaţie de precursori numită balama cordoneurală. Sunt analizate expresia *Shh* şi *HNF-3/3.* Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S. (1996) *The molecular biology of axon guidance.* Science 274, 1123 – 1133

109

Thisse, C, Thisse, B. (1999) *Antivin, a novei and divergent member of the TGFP superfamily, negatively regulates mezoderm induction.* Development 126.

229 – 240 Thisse, B., Wright, C.V., Thisse, C. (2000) *Activinând Nodal-related factors control antero-posterior patterning in the zebrafish embryo.* Nature 403.

425 – 428 Thomas, P., Beddington, R. (1996) *Anterior primitive endoderm may be responsible for patterning the anterior neural plate in the mouse embryo.*

Curr. Biol. 6, 1487 – 1496 Thomas, P.Q., Brown, A., Beddington, R. – S.P. (1998) *Hex: a homeobox gene revealing peri-implantation asymmetry in the mouse embryo and an early transient marker of endothelial celiprecursors.* Development 125, 85 – 94 Toivonen, S. (1978) Regionalization of the embryo. În: Nakamura, O., Toivonen.

S. (Eds.): *Organizer – A Milestone of a Half-century since Spemann* (pp.

119 – 156). Elsevier, Amsterdam Tsuchida, T., Ensini, M., Morton, S.B., Baldassare, M., Edlund, T., Jessell, T. M.

Pfaff, S.L. (1994) *Topographic organization of embryonic motor neurons definea by expression of LIM – homeobox genes.* Cell 79, 957 – 970 Vaage, S. (1969) *The segmentation of the primitive neural tube în chick embryo*

(Gallus domesticus). Adv. Anat. Embryol. Cell Biol. 41, 1 – 88 van Straaten, H.W.M., Hekking, J.W.M., Wiertz-Hoessels, E.L., Thors, F.

Drukker, J. (1988) *Efect of the norochord on the differentiation of afloor plate area in the neural tube of the chick embryo.* Anat. Embryol. 177.

317 – 324 van Straaten, H.M.W., Hekking, J.W.M. (1991) *Development of floor plate, neurons and axonal outgrowth paltern in the early spinal cord of the norochord-deficient chick embryo.* Anat. Embryol. 184, 55 – 63 Varlet. L, Collignon, J., Robertson, E.J. (1997) *Nodal expression in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation.* Development 124, 1033 – 1044 Venter, J. C, Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G. G.

Smith, H.O., Yandell, M, Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J. D…

Amânatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H. & coiab. (2001) *The sequence of the human genome.* Science 291, 1304 – 1351 von Baer, K. E. (1828) *Über Enhvicklungsgesichichte der Thiere: Beobachtung und Reflexion.* I Theil, Bomträger, Königsberg von Kupffer, K. (1906) Die Morphogenie der Zentralnervensystems. În: O.

Hertwig (Ed.): *Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwiclungslehre der Wirbeltiere* (vol. II). Gustav Fischer, Jena Waddington, C.H. (1932) *Experiments on the development of chick and*

duck embryos cultivated in vitro. Philos. Trans. R. Soc. Ser. B Lond. 221, 179 – 230 Waddington, C.H. (1933) *Induction by the primitive streak and its derivatives in the chick.* J. Exp. Biol. 10, 38 – 46 110

*

„Wang, Y., Jones, F.S., Krushel, L.A., Edelman, G.M. (1996) *Embryonic expression patterns of the N-CAM gene are regulated by homeodomain bindingsites.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1892 – 1896 Primul studiu în care se arată că, expresia moleculei de adeziune N-CAM este controlată *in vivo,* la nivelul măduvei spinării, de factori de transcripţie cu homeocasetă.

Warkany, L, Schraffenberger, E. (1946) *Congenital malformations induced în rats by maternal vitamin A deficiency.* Arch. Ophtalmol. 35, 150 – 169

Wassarman, K.M., Lewandoski, M., Campbell, K., Joyner, A.L., Rubenstein, J.L., Martínez, S., Martin, G.R. (1999) *Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mici/hindbrain organizer is dependent on Gbzunction.* Development 124, 2923 – 2934

Wilson, V., Beddington, R.S. (1996) *Cellfate and morphogenetic movement in the late mouseprimitive streak.* Mech. Dev. 55, 79 – 89

Wingate, R.J.T. (2001) *The rhombic lip and early cerebellar development.* Curr. Opin. Neurobiol. 11, 82 – 88

„Wingate, R.J.T., Hatten, M.E. (1999) *The role of the rhombic lip în avion cerebellum development.* Development 126, 4395 – 4404 O sinteză în care sunt prezentaţi factorii moleculari care asigură inducţia morfogenezei cerebelului şi mecanismele de ghidare ale celulelor pe diferitele căi migratorii.

Wong, E.V., Kenwrick, S., Willems, P., Lemmon, V. (1995) *Mutations in the cel! adhesion molecule îl cause mental retardation.* Trends Neurosci. 18, 168 – 172

Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J., Jessell, T.M. (1991). *Control of cell pattern in the developing nervous sistem: Polarizing activity of the floorplate andnotochord.* Cell 64, 635 – 647

„Yamaguchi, T.P., Takada, S., Yoshikawa, Y., Wu, N., McMahon, A.P. (1999) *T (Brachyury) is a direct target of Wntă a during paraxial mezoderm specification.* Genes & Dev. 13, 3185 – 3190

Studiu foarte elegant în care este indicat că WNT-3 a modulează, prin intermediul factorului de transcripţie *T,* balanţa dintre celulele

care se diferenţiază în mezoderm şi cele care se diferenţiază în ectoderm şi, apoi, neuroectoderm.

Yoon, M.-S., Puelles, L., Redies, C. (2000) *Formation of cadherin-expressing brain nudei în diencephalic alar plate subdivisions.* J. Comp. Neurol. 421, 461 – 480

Yoshikawa, Y., Fujimori, T., McMahon, A.P., Takada, S. (1997) *Evidence that absence of Wnt-3 a signaling promotes neuralization instead of paraxial mezoderm development in the mouse. Dev.* Biol. 183, 234 – 242

Zaraisky, A.G., Ecochard, V., Kazanskaya, O.V., Lukyanov, S.A., Fesenko, I.V., Duprat, A.M. (1995) *The homeobox-containing gene XANF-1 may control development of the Spemann organizer.* Development 121, 3839 – 3847

Zimmermann, L.B., De Jesus-Escobar, J.M., Harland, R.M. (1996) *The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4.* Cel! 86, 599 – 606

Capitolul 3

SPECIFICAREA ARIILOR CORTICALE. NEUROGENEZA ŞI MIGRAREA NEURONALĂ

CONŢINUTUL CAPITOLULUI:

Neurogeneza, migrarea neuronală şi dezvoltarea corticală

Formarea hărţii funcţionale a cortexului cerebral

Neurogeneza în creierul adult. Precursorii neuronali şi terapia celulară

Regulile vieţii şi ale morţii: senescenţa şi moartea celulară

Rezumat

Cortexul cerebral oferă exemplul cel mai reprezentativ de proiect al unei structuri nervoase cu o organizare ingenioasă şi economică. Pe baza citoarhitecturii, Brodmann (1909) a standardizat observaţiile care indicau că, după maturare, cortexul cerebral poate fi împărţit în regiuni morfologic distincte, relativ specializate funcţional şi beneficiind de conexiuni specifice. Pentru neuroanatomişti, interesul pentru studiul cortexului cerebral este provocat de diversitatea celulelor şi a conexiunilor neuronale. În ultimă instanţă, tipurile de neuroni pot fi împărţite în celule piramidale, celule stelate şi celule fusiforme care sunt organizate în straturi şi coloane. Mai mult, cortexul poate avea de la trei straturi de neuroni (arhicortex, cum ar fi girusul

dinţat sau cornul lui Ammon din hipocamp; paleocortex, cum ar fi cortexul piriform) până la şase straturi (neocortex). Dat fiind că această clasificare se bazează pe postularea vârstei filogenetice a unui tip de cortex, o categorizare neutră teoretic recunoaşte existenţa a două feluri de cortex: alocortex (arhişi paleocortex) şi izocortex (neocortex) (pentru detalii, vezi: Duvernoy, 1998, pp. 6 – 9; Nauta & Feirtâg, 1986, pp. 289 – 306). Pentru neurofiziologi, cortexul cerebral defineşte problema explicării distribuirii unei funcţii cum ar fi limbajul, de pildă, între mai multe arii corticale relativ specializate. Aceste arii formează o hartă funcţională a cortexului cerebral care este similară între indivizi şi are trăsături topologice comune la diferite specii de mamifere. Pentru neuroembriolog, metodele moleculare au indicat expresia diferenţiată spaţial şi temporal a unor gene care delimitează anumite arii pe cortexul cerebral. Tot mai multe studii argumentează – că formarea cortexului cerebral este controlată prin mecanisme moleculare comune, care acţionează şi în restul sistemului nervos (vezi: Puelles, 1995 şi referinţele). Doar că regionalizarea funcţională pune în joc modelarea organizării celulare şi după reguli derivate din activitatea nervoasă.

Pentru neurobiologul evoluţionist, cortexul cerebral a însemnat mult timp un prototip al vârfului de evoluţie a creierului la primate. De aici, s-a postulat că performanţele cognitive şi comportamentale ale oamenilor e probabil să fie susţinute de expansiunea cortexului cerebral. Nu mai revenim la referinţele recente

care provoacă acest postulat (vezi: capitolul anterior). Şi aici se verifică ceea ce deja am notat cu privire la explicarea evoluţiei creierului strict pe baza facilitării flexibilităţii comportamentale. Pe scurt, studiile volumetrice arată că nu există dovezi care să indice faptul că izocortexul este obiectul unei selecţii diferenţiate (Finlay & Darlington, 1995; Clancy, Darlington & Finlay, 2000). El a evoluat odată cu alte structuri cum ar fi cerebelul. Cum putem explica această decuplare evolutivă care a dus la expansiunea unor structuri cum ar fi cerebelul sau izocortexul la primate şi la om? Ar fi la îndemână să postulăm că adaptarea în nişa ecologică a selectat acele structuri nervoase care susţin comportamentele care au evoluat. Sigur, principiul este plauzibil, doar că, din nou, nu oferă o explicaţie completă. Izocortexul şi cerebelul au în comun, în afară de legătura cu

funcţii sau comportamente care au evoluat la primate, faptul că celulele care populează aceste structuri sunt generate târziu în cursul neurogenezei. S-a observat că prelungirea şi modificarea ciclului celular al prbgenitorilor generaţi în valurile târzii de neurogeneză sunt mecanismele prin care unele structuri nervoase s-au dezvoltat fără precedent la primate.

După cum ne putem da seama, cortexul cerebral nu este o simplă porţiune continuă de neuroepiteliu care se formează din telencefal. El are o structură şi organizare celulară foarte diversă. La nivelul cortexului cerebral, regionalizarea presupune marcarea moleculară a unor câmpuri de creştere care dau naştere la citoarhitecturi distincte. Interacţiunea dintre mecanismele de creştere şi plasticitatea neuronală activitate-dependentă modelează aceste citoarhitecturi delimitând regiuni funcţionai distincte (pentru argumente teoretice, vezi: Quartz & Sejnowski, 1997; Greenough, Black & Wallace, 1996, pp. 291). Aceste regiuni formează o hartă funcţională în care fiecare arie este conectată prin circuite uneori foarte complicate cu alte structuri nervoase. Dacă decupăm cortexul cerebral de aceste circuite nervoase nu putem explica verosimil evoluţia comportamentelor. Aceasta înseamnă să nu acceptăm teze localizaţioniste radicale care consideră că, de pildă, memoria sau limbajul sunt susţinute de arii corticale specializate (Miu & Olteanu, 2002). De aici, nici că structura cortexului cerebral ar fi evoluat separat de restul creierului. Dincolo de aceste exagerări, însă, se găseşte, de fapt, un Graal al neuroştiinţelor: să înţelegem cum se stabileşte această hartă funcţională şi cum variază ea între indivizi şi specii.

Revenind la atotinvocata adaptare la mediul nonstaţionar, aceasta presupune un mecanism de învăţare flexibil, nonstaţionar (asimilăm aici învăţarea unui mecanism general de adaptare; după referinţa originară: Quartz & Sejnowski, 1997). În cazul unui astfel de mecanism de învăţare, învăţarea trebuie să poată produce schimbări semnificative la nivelul structurilor care o susţin. Această penetrantă comportamentală a structurilor nervoase, denumită mai frecvent neuroplasticitate, permite ca un comportament să se stabilizeze la nivel neuronal astfel ca, la o nouă confruntare cu problema care a solicitat generarea sa, acesta să poată fi activat, fără a mai fi reluată elaborarea sa. Un astfel de suport fizic pentru un mecanism de

învăţare nonstaţionar, cum este creierul, trebuie surprins „în mişcare" (B. L. Finlay, comunicare personală). În cazul nostru, evoluţia şi

dezvoltarea oferă oportunitatea de a studia construirea hărţii funcţionale prin modelarea zonelor citoarhitonic distincte (Kingsburry & Finlay, 2001; vezi şi: Finlay & Niederer, 1999). Acesta este motivul pentru care vom studia în detaliu mecanismele de creştere ale cortexului cerebral, abordând procese ca neurogeneza fetală şi migrarea neuronală. Odată precizate aceste mecanisme de creştere, vom descrie argumentele experimentale care arată cum se stabileşte harta funcţională a cortexului cerebral, la aceasta contribuind mecanisme genetice şi epigenetice. Vom descrie, deci, cortexul cerebral „în mişcare".

3.1 Neurogeneza, migrarea neuronală şi dezvoltarea corticală

Neurogeneza este procesul prin care iau naştere neuronii, incluzând aici procesul proliferativ prin care se formează populaţia (*pool-ul)* de progenitori neurali, ca şi procesul prin care celulele ies din ciclul celular proliferativ (Hollyday, 2001). Neurogeneza este un proces cu un anumit program spaţio-temporal: pool-ul de progenitori este localizat în zona ventriculară a tubului neural, majoritatea neuronilor fiind generaţi înainte de naştere; înţelegem acum de ce, aşa cum spuneam, naşterea nu este un eveniment neuronal major. Controlul care instruieşte acest program de dezvoltare este exercitat de mecanisme moleculare comune, care contribuie la morfogeneza întregului tub neural. Altfel spus, neurogeneza nu trebuie studiată izolat de procesele morfogenetice simultane din restul tubului neural. Dar nici morfogeneza nervoasă nu poate fi înţeleasă fără a cunoaşte regulile neurogenezei. Acest fapt este rezumat de doi dintre pionierii neurobiologiei dezvoltării, V. Hamburger şi R. Levi-Montalcini, care atrag atenţia că „Orice discutare a problemelor determinării topografice şi regionale, [...], trebuie să includă determinarea comportamentului mitotic, care a precedat şi este fundamental pentru diferenţiere" (Hamburger & Levi-Montalcini, 1950, pp. 129).

Neurogeneza este o lecţie frumoasă de neurobiologie, cu atât mai mult cu cât este şi un exemplu fericit de problemă în care progresele au fost relativ constante şi s-au adăugat la înţelegerea dinamicii celulare şi, apoi, a controlului molecular al neurogenezei.

Tocmai de aceea, vom trece în revistă o parte din cercetările clasice în care sunt descrise structura şi comportamentul mitotic al celulelor din tubul neural aflat în perioada morfogenezei timpurii.

La sfârşitul secolului XIX, W. His a observat că o caracteristică a tubului neural în perioada embriogenezei timpurii este aglomerarea celulelor care proliferează, denumite atunci „celule germinative", într-o zonă adiacentă lumenului (zona ventriculară). His considera că aceste celule rămân în zona lumenului unde se divid repetat pentru a produce celule fiice care ar fi împinse din ce în ce mai lateral, pe măsura neurogenezei. De aici, His conchidea că peretele tubului neural este un epiteliu stratificat (His, 1889; dar şi; Ramón y Cajal, 1906, pp. 250 – 253). În anii '30, F.C. Sauer este cel care arată că, de fapt, neuroepiteliul este un epiteliu pseudostratificat. Celulele neuroepiteliale aderă strâns una de alta prin joncţiuni numite bare terminale. Celulele neuroepiteliale sunt celule polarizate morfologic. Partea bazală a celulelor neuroepiteliale se termină sub forma unui picior sau buton

115

plat care aderă de lamina bazală a tubului neural. În partea apicală, membrana celulei se află în contact cu membrana lumenului tubului neural, celulele fiind solidarizate prin joncţiuni specializate. Astfel de joncţiuni sunt, de pildă, barele terminale caracterizate ca şi conexiuni intercitoplasmatice foarte puternice, care rezistă chiar şi la forţe mecanice mari determinate de acumularea locală de celule turgescente blocate în metafază prin administrarea de colhicină**1** (vezi: mai jos; Fawcett, 1961). Celulele sunt conectate şi prin joncţiuni laterale. Astfel, tubul neural trebuie conceput ca un evantai în care celulele sunt solidarizate în partea bazală cu membrana lumenului, în partea apicală şi lateral, impunând celulelor un anumit model de creştere (de ex., Watterson & Fowler, 1953).

His observase că fusul de diviziune este de cele mai multe ori perpendicular pe planul lumenului, dar Sauer arată că, din contră, majoritatea celulelor au fusul paralel cu acest plan (Sauer, 1935 a). Tot Sauer descrie pentru prima dată ceea ce putem numi comportament mitotic al celulelor din zona proliferativă din tubul neural. Într-o serie de studii descriptive de o eleganţă desăvârşită (Sauer, 1935 b, 1936; dar şi: Sauer & Walker, 1959), prin măsurarea distanţei dintre nucleul unor astfel de celule în diferite faze ale mitozei şi planul lumenului, el

indică faptul că celulele mitotice aflate la începutul profazei, în diferite faze intermitotice sau la sfârşitul telofazei nu pot fi identificate în zona adiacentă înmenului. Până în anii ’60, din cauză că aceste observaţii nu erau probate experimental, cercetările lui Sauer nu au fost foarte cunoscute. S. Fujita (1960) este unul din primii cercetători care oferă dovezi şi resuscită conceptul de „migrare interkinetică” propus de F.C. Sauer. O metodă simplă prin care poate fi testată teoria lui Sauer presupune injectarea locală a unei soluţii de colhicină, un I citostatic care blochează celulele în metafază. Dacă teoria lui Sauer este adevărată, administrarea repetată de colhicină va bloca straturi sau generaţii de celule în metafază. Acest fapt a fost demonstrat experimental de B. Källen în diferite regiuni ale tubului neural la embrionul de găină (placa podelei, placa tavanului, suprafaţa ventriculară a mezencefalului) (Källen, 1961, 1962).

Migrarea nucleară interkinetică, adică migrarea intracitoplasmatică a nucleului unei celule neuroepiteliale, se realizează prin intermediul microtubulilor, organite care sunt prezente în celulele aflate în interfază. Locaţia nucleului celulei neuroepiteliale depinde de faza mitotică prin care trece aceasta (Fig. 3.1): în faza S, în care celula sintetizează ADN, nucleul este vizibil în jumătatea externă a neuroepiteliului după care, în faza G2, nucleul migrează către zona ventriculară, iar celula îşi retrage procesul bazai, păstrându-l doar pe ce! apical. În această etapă, celulele prezintă mai puţini microtubuli şi devin aproape sferice până intră în profază; ele vor rămâne în zona ventriculară până în telofaza târzie. După: diviziune, celula trebuie să decidă dacă repetă sau iese din ciclul celular. Dacă celula reintră în mitoză, ea îşi restabileşte procesul bazai. Celulele care au ieşit din;

1 Colhicină este o substanţă citostatică, extrasă din bulbul de brânduşă *(Colchicina autumnalis),* care are, deci, şi proprietatea de a bloca secvenţe ale unor procese active cum ar fi neurogeneza.

ciclul mitotic se pot diferenţia în neuroni sau celule gliale şi sunt considerate „născute” (celule în faza Go). „Data naşterii” unui neuron este definită ca momentul când celula iese din ciclul celular. Practic, acest moment este stabilit prin metode de încorporare a timidinei sau a unor derivaţi cum ar fi bromodeoxiuridina; dat fiind că aceste substanţe sunt încorporate doar de celulele aflate în faza S,

probabilitatea ca o celulă care nu le mai încorporează să iasă din ciclul celular este considerată semnificativă (pentru detalii, vezi: Hayes & Nowakowski, 2000, dar şi: Rakic, 2002; Gould & Gross, 2002). Deci data naşterii unui neuron este operaţionalizată ca momentul în care o celulă sau o populaţie celulară nu mai încorporează markerul fazei de sinteză a ADN. Aceste celule se acumulează într-o zonă denumită intermediară, unde încep să se diferenţieze. Aria care în această perioadă este lipsită de neuroni se numeşte arie marginală. Această terminologie a fost stabilită de Comitetul Boulder (1970) care a definit şi zona ventriculară ca fiind regiunea de neuroepiteliu care delimitează mişcarea de înainte-înapoi a nucleului celulelor.

Specificarea identităţii celulare

„Decizie" de a ieşi sau de a reintra în ciclul celular

GI

Fig. 3.1 *Ciclul celular al celulelor neuroepiteliale. Migrarea nucleată interkinetică între suprafaţa ventriculară (jos) şi suprafaţa piaţă (sus) este corelată cu stadiul din ciclul celular în care se află celula. Astfel, nucleii se îndepărtează de suprafaţa ventriculară în Gî şi intră în faza S atunci când se află în partea mai superficială a zonei ventriculare. În G2, se reîntorc spre suprafaţa ventriculară unde suferă mitoză (M). După ce mitoză s-a terminat şi celulele fiice intră în GI, acestea trebuie să „decidă" dacă se diferenţiază sau reintră în ciclul celular. În primul caz, celula trebuie să îşi piardă conexiunile (de ex., barele terminale) care le leagă de suprafaţa ventriculară (porţiuni îngroşate la baza celulelor din diagramă).* (Modificat după Holâyday, 2001)

V. Hamburger (1948) a arătat că, în cazul măduvei spinării, există diferenţe între placa bazală şi placa afară în ceea ce priveşte densitatea celulelor aflate în mitoză. În timpul morfogenezei timpurii, neurogeneza este mai intensă în placa

bazală pentru ca, mai târziu pe parcursul dezvoltării, scorul neurogenezei să devină favorabil plăcii alare. Aceste observaţii sugerează fie că densitatea celulelor proliferative în cele două zone este diferită, fie că ciclurile celulare îşi modifică durata (vezi: Hollyday, 2001). Verificarea acestor două ipoteze a presupus elucidarea mecanismului molecular care susţine ciclul celular şi este fundamentală pentru înţelegerea neurogenezei. Majoritatea studiilor au indicat că durata ciclului celular este diferită în funcţie de regiune şi

perioadă de dezvoltare. În cazul izocortexului de la şoarece, Takahashi, Nowakowski şi Caviness (1993, 1995) au arătat că durata ciclului celular este mai mare, fiind semnificativă mai ales prelungirea fazei Gl5 faţă de durata fazelor S şi G2 + mitoză) care rămân relativ constante. Observaţii similare au fost raportate în cazul izocortexului şobolanului şi tectumului optic de la embrionul de găină (coliculii superiori la mamifere superioare) (Waechter & Jaensch, 1972; Wilson, 1973). Cercetări asupra ciclului celular al celulelor din retina şobolanului au indicat o prelungire a fazei S (vezi, pentru discuţii: Alexiades & Cepko, 1996). În general, ciclul celular este mai lung pe măsură ce se avansează în dezvoltare. Regula se poate extrapola şi în cazul speciilor cum ar fi primatele al căror izocortex pare să fi evoluat prin modificarea comportamentului mitotic, aşa cum îl numea Hamburger. Într-un studiu recent, Kornack şi Rakic (1995) arată că durata ciclului celular este de aproximativ cinci ori mai mare în cazul zonei ventriculare dorsale a primatelor faţă de şobolani. Aceşti autori sugerează, poate cel mai direct, că una din cheile evoluţiei izocortexului la primate este comportamentul mitotic:

„[...] durata, cursul dezvoltării şi numărul de diviziuni succesive ce constituie perioada neurogenetică au fost considerabil modificate din vremea când rozătoarele şi primatele au împărţit ultima oară un strămoş comun, acum mai mult de 70 de milioane de ani. [...] Această disociere temporală a dinamicii proliferative de determinarea identităţii laminare în timpul evoluţiei a oferit un pas esenţial care a condus spre extinderea corticală la primate". (Kornack & Rakic, 1995, pp. 1246)

După această incursiune în care am expus unele din trăsăturile şi mecanismele generale ale neurogenezei, vom încerca să particularizăm acest proces în cazul morfogenezei cortexului cerebral. Cercetări clasice (de ex., Rakic, 1988) au arătat că majoritatea neuronilor care vor forma cortexul cerebral se formează în zona ventriculară dorsală a telencefalului. Zona ventriculară ventrală se considera că asigură exclusiv neuronii ce vor forma striatumul şi pallidumul, ce fac parte din ganglionii bazali. Vom vedea că studii recente au arătat că zona ventriculară dorsală nu este sursa unică de neuroni pentru izocortex. E adevărat, majoritatea viitorilor neuroni ai izocortexului se formează în zona dorsală, în cazul lor fiind documentată şi cea mai importantă formă de migrare neuronală şi

stând, totodată, la baza unui model general de dezvoltare a cortexului cerebral. Vom expune, deci, cum decurge neurogeneza în zona ventriculară dorsală, urmând să descriem apoi şi unele rezultate complementare mai recente.

Zona germinativă principală în care se formează neuronii ce vor popula cortexul cerebral este zona ventriculară dorsală. Aici, pool-ul de celule

proliferează, celulele ce părăsesc ciclul de diviziune şi urmează a se diferenţia în neuroni migrând dincolo de neuroepiteliu şi formând un strat cortical plexiform primordial numit preplacă (Marin-Padilla, 1978; Rickmann, Chronwall & Wolff, 1977; Wood, Martin & Price, 1992). La om, preplacă se formează începând cu ziua a 35-a după fecundaţie până în săptămâna a 9-a. Aceşti neuroni primordiali se numesc neuroni pionieri, o parte formând o zonă intermediară între zona ventriculară şi preplacă (Fig. 3.2). Neuroblaştii care rezultă după formarea preplăcii din progenitorii din zona ventriculară migrează spre preplacă şi o împart într-o zonă marginală aflată imediat sub suprafaţa piaţă şi o zonă numită subplacă, localizată între placa corticală nou formată şi zona intermediară. J.B. Angevine şi R.L. Sidman (1961) au indicat pentru prima dată că, după formarea plăcii corticale, progenitorii neuronali migrează printre neuronii deja agregaţi în placa corticală, deci, într-o secvenţă „dinăuntru în afară". Astfel, din placa corticală se formează straturile VI-II ale izocortexului matur, în această ordine: prima generaţie de neuroni ai plăcii corticale formează stratul VI, următoarea generaţie migrează din zona ventriculară, traversează zona intermediară şi subplacă şi migrează mai departe printre neuronii stratului VI, formând în regiunea adiacentă zonei marginale stratul V ş.a.m.d. Zona marginală conţine celule numite Cajal-Retzius şi alte tipuri de neuroni care, vom vedea, au un rol important în migrarea neuronală; din neuronii zonei marginale se formează stratul I al izocortexului. Odată cu maturarea izocortexului, zona intermediară va intra în constituţia substanţei albe, ajungând să conţină porţiuni din axonii fibrelor aferente şi eferente ale izocortexului. Pe măsură ce placa corticală se formează şi zona ventriculară îşi reduce activitatea proliferativă, între zona ventriculară şi zona intermediară se formează o zonă germinativă secundară numită zonă subventriculară care va persista în viaţa postnatală.

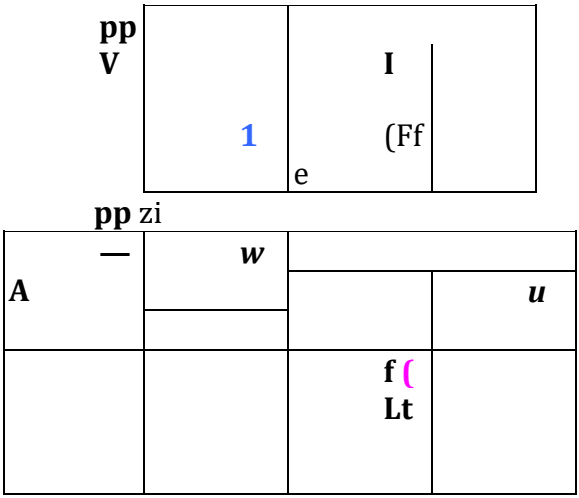

Fig. 3.2 *Dezvoltarea normală a cortexului cerebral.* PC, placă corticală; PP, preplacă; SP, subplacă; V, zonă ventriculară; ZI, zonă intermediară; ZM, zonă marginală; ZSV, zonă subventriculară. (Modificat după Uylings & colab., 1994)

Subplacă care se formează prin împărţirea preplăcii de către placa corticală este foarte bine populată cu celule în cazul izocortexului, faţă de cortexul piriform sau hipocamp unde acest strat de celule formează un strat îngust de celule. La fetusul uman de 28 de săptămâni, în lobul frontal, de pildă, subplacă este de

119

circa 5 ori mai groasă decât placa corticală. Unele cercetări au arătat că neuronii din subplacă atrag aferente ale izocortexului cum ar fi proiecţiile talamocorticale şi ghidează unele eferenţe corticofugale (Ghosh & colab., 1990; Ghosh & Shatz, 1993). La şobolani, subplacă se transformă în stratul VIB, în timp ce în izocortexul uman matur, această regiune nu mai este vizibilă.

Zona marginală conţine numeroase tipuri de neuroni, dintre aceştia cel mai bine studiaţi fiind celulele Cajal-Retzius, numite aşa pentru că au fost descrise pentru prima dată de S. Ramón y Cajal (1911) şi G. Retzius (1893). Pe lângă celulele Cajal-Retzius a fost dovedită şi existenţa unor celule mai mici care sunt interneuroni GABA-ergici, precum şi a celulelor gliale şi a unor celule granulare subpiale (Marin-Padilla, 1995; Uylings & Delalle, 1997). Printre primele aferente care ajung ia zona marginală a izocortexului sunt proiecţiile monoaminergice (dopamină, serotonină, noradrenalină) de

la trunchiul cerebral. În hipocamp, neuronii din zona marginală strâng majoritatea aferentelor, spre deosebire de cei din izocortex; zona marginală din această porţiune de alocortex va forma stratul radial şi stratul lacunos-molecular (pentru detalii, vezi: O'Keefe & Nadei, 1978, pp. 111 – 112). În izocortex, zona marginală conţine şi terminaţiile dedritelor apicaie ale neuronilor piramidali.

M. Marin-Padiila (1984) a sugerat pentru prima dată că, datorită localizării celulelor Cajal-Retzius în zona marginală, deasupra plăcii corticale în dezvoltare, acestea ar putea avea un rol important în dezvoltarea cortexului cerebral Această ipoteză s-a verificat prin numeroase experimente care au specificai roiul acestor celule din zona marginală. Nu vom detalia, deocamdată, funcţia celulelor Cajal-Retzius datorită implicării lor în migrarea neuronală, temă care va ocupa următorul paragraf. Vom descrie aici doar morfologia acestor celule. Celulele Cajal-Retzius sunt distribuite omogen în zona marginală. Deşi, pe baza morfologiei, au fost descrise numeroase subtipuri, cele mai obişnuite celule Cajal-Retzius sunt neuroni orizontali bipolari; acestea au un axon care proiectează spre partea inferioară a zonei marginale şi care va fi mielinizat, iar dendritele verticale se extind către suprafaţa piaţă (Marin-Padilfa, 1990).

Înainte de a vedea cum neuronii care proliferează din zona ventriculară migrează pentru a forma placa corticală, vom discuta una din observaţiile cele mai interesante de neuroanatomie comparativă. Una din caracteristicile cortexului cerebral al mamiferelor este migrarea după secvenţa „dinăuntru în afară", în care neuronii care vor forma straturile mai superficiale trebuie să treacă printre straturile mai timpurii ale plăcii corticale. Această secvenţă este valabilă şi pentru izocortex, şi pentru aâocortex, excepţie făcând unul din straturile hipocampului, girusul dinţat, care se dezvoltă dinafară spre zonele mai profunde (pentru detalii, vezi: Stanfield & Cowan, 1988). La reptile, cortexul este format din trei straturi: stratul I, cel mai superficial, cu puţine celule care îşi extind dendrite tangenţial, un strat II ale cărui celule îşi trimit dendritele către stratul I şi stratul III, cu o densitate celulară mică (Fig. 3.3; Ten Donkelaar, 1988). Aceste straturi corticale se formează tot dintr-o placă corticală ce împarte o subplacă (pentru discuţii, vezi: Aboitiz, Morales & Montiel, 2001).

Diferenţa dintre cortexul reptilian şi cortexul mamiferelor poate

provoca, aşa cum, de altfel, s-a şi întâmplat, postularea unei teorii care să susţină o diferenţă evoluţionistă. Acolo unde evoluţia nu mai poate fi urmărită reconstituind toate verigile, există loc pentru teorii despre „decuplări" inexplicabile ale evoluţiei unei structuri cum ar fi cortexul cerebral, de pildă, la o specie superioară. Să luăm numai un exemplu. În anii '70—80, J. MacLean propune o teorie a creierului triunitar; el postulează că creierul a evoluat în trei organizări: creierul reptilian, creierul paleomamiferelor (creierul limbic) şi cel al neomamiferelor (mai ales izocortexul), fiecare putând funcţiona relativ independent şi având un tip de inteligenţă, memorie, funcţii motorii şi motivaţionale specifice (pentru detalii, vezi: Zuckerman, 1991). Cu o astfel de teorie despre evoluţia creierului, de aici şi până la intervenţia extratereştrilor nu mai e mult! Alternativa ştiinţifică este oferită, din nou, de aplicarea metodelor biologiei moleculare. În continuare, vom aborda mai întâi problema migrării neuronale, urmând să revenim la problema ordinii formării straturilor corticale. Ordinea expunerii, deşi pare sinuoasă, ne permite documentarea abordărilor de sinteză ale dezvoltării cortexului cerebral, pe care le vom păstra pentru ultimele paragrafe.

Ajk".

B

] IV S

?)...; =.

V

VI

Fig. 3.3 *Comparaţie între structura celulară a izocortexului de la mamifere (şobolan) cu cortexul dorsal de la reptile (iguană, Liolaemus tenuis). Izocortexul mamiferelor cuprinde şase straturi, din care stratul I corespunde zonei marginale, iar straturile II-VI se formează din placa corticală. Cortexul reptilelor este compus dintr-un strat care corespunde zonei marginale (stratul I), urmat de un strat dens în celule (stratul II) şi stratul profund, cu densitate celulară mai redusă (straturile III),* v, zonă ventriculară. Bară la scală: 50 um. (Adaptat după Aboitiz, Morales & Montiel, 2001, cu permisiunea autorilor)

121

Să reluăm procesele prin care se formează izocortexul. Mai întâi, celulele din zona ventriculară proliferează. Progenitorii neuronali sau neuroblaştii, celule nervoase tinere (vezi: Fig. 3.4), migrează spre preplacă pentru a forma placa corticala. Dar cum migrează aceste

celule? Cercetările de pionierat care au elucidat această problemă au fost efectuate de P. Rakic şi colaboratorii. Rakic a arătat că neuronii postmitotici migrează de-a lungul unor celule non-neuronale care s-au dovedit a fi celule gliale orientate radial, care formează platforme pentru migrarea radială a neuroblaştilor (pentru distribuţia celulelor gliale radiale în telencefal, vezi: Fig. 3.5; Rakic, 197 la). Aceste cercetări au indicat o legătură specială între neuroni şi celule gliale, o temă intensiv investigată din anii '80 fiind adeziunea neuron-celulă glială (Rakic, 1985 a; pentru o discuţie, vezi: Hatten, 1999). De fapt, primele observaţii asupra existenţei unor celule „binucleate" care au legături atât cu peretele ventricular, cât şi cu suprafaţa piaţă au fost făcute de M. Berry şi A.W. Rogers (Berry & Rogers, 1965).

conuri de creştere

Fig. 3.4 *Neuroblaşti de la embrionul de găină după 60 de ore de incubaţie. A, B, celule din secţiuni etichetată prin metoda Golgi, respectiv, metoda nitratuhti de argint redus.* (Modificat după Ramón y Cajal, 1906)

P. Rakic a studiat migrarea neuronală efectuând secţiuni seriale pe care le-a examinat la microscopul electronic (Rakic, 1972). Altfel spus, el a urmărit traseul unei celule care migrează pe mai multe secţiuni succesive. Reconstruirea tridimensională, cu ajutorai computerului, a acestor secţiuni ultrafine a indicat că celulele care migrează au procese de creştere care aderă la membrana a mai mult celule gliale radiale (Rakic & colab., 1974). Migrarea neuronilor corticali pe platforma celulelor gliale radiale este, deci, un proces dinamic, care presupune extinderea şi retragerea unor procese de creştere. Aceste cercetări asupra cortexului cerebral au fost urmate de confirmarea rolului celulelor gliale radiale în cerebel şi hipocamp (Rakic, 197 lb; Nowakowski & Rakic, 1981).

Scoarţa cerebeloasă este un sistem experimental clasic în care au fost dovedite existenţa şi rolul celulelor gliale în migrarea celulelor granulare (vezi: Uzman, 1960; Miale & Sidman, 1961). Cel mai evident avantaj este că

ZM

CA

Fig. 3.5 *Diagramă după o secţiune transversală etichetată prin metoda Golgi, prin telencefalul unui şobolan la E 18. Se poate observa*

reţeaua de celule gliale radiale. AP, arie preoptică; CA, comisura anterioară; CI, capsula internă; FX, fornix; PC, placă corticală; S, septum; Str, primordiul striatumului: TO, tuberculul olfactiv; V, ventricul lateral; V III, ventriculul III; ZI, zona intermediară; ZM, zonă marginală; ZV, zonă ventriculară. (Modificat după de Carlos, Lopez-Mascaraque & Valverde, 1996)

citoarhitectonica regulată a acestei structuri este bine cunoscută, iar numărul de celule şi interacţiuni celulare este relativ redus (Ramón y Cajal, 1911; Goldowitz & Hamre, 1998). În această structură, celulele granulare, după ieşirea din ciclul celular migrează din stratul granular extern, ghidate de fibrele gliale Bergmann care sunt situate în partea superficială a stratului molecular şi permit acestor celule să ajungă în stratul celulelor Purkinje şi în stratul granular intern **(Fig.** 3.6; pentru anatomia scoarţei cerebeloase, vezi: Fulton, 1949, pp. 106 – 114 sau Fulton, 1953, pp. 98 – 104; dar şi: Olteanu, Lupu & Miu, 2001, pp. 104 – 108). Cercetările lui H. Komuro şi P. Rakic au investigat relaţia dintre neuronii care migrează şi celulele gliale folosind metoda înregistrării în timp real a migrării celulare în preparate acute de scoarţă cerebeloasă (Komuro & Rakic, 1995, 1997).

În stratul molecular, celulele granulare au ca suport de migrare fibrele gliale Bergmann, dar după pătrunderea în stratul celulelor Purkinje şi, apoi, în stratul granular intern, celulele granulare pierd contactul cu ghidul glial. S-a arătat că, în general, modul şi rata migrării neuronale în sistemele nervos periferic şi central depinde de interacţiuni prin intermediul membranei celulei granulare cu mediile celulare cu care această celulă are contact în timpul migrării (pentru o sinteză, vezi: Hatten, 1999; Rakic, 1990). Migrarea celulelor granulare ilustrează cel mai bine acest principiu pentru că acestea îşi modifică morfologia, modul şi

ritmul de migrare ca răspuns la semnalele receptate în mediul celular pe care îl traversează, fie el stratul molecular, al celulelor Purkinje sau stratul granular intern. Astfel, în stratul molecular, celulele granulare au un aspect bipolar, cu două procese de creştere: un proces pionier sau conducător *(leading process)* şi un proces posterior *(trailing process).* Celula migrează activ, traversează stratul molecular şi pătrunde în stratul celulelor Purkinje. Procesul pionier prezintă conuri de creştere sub forma unor lamelopodii şi filopodii,

ceea ce dovedeşte că celula s-a desprins de pe suportul glial. Odată cu desprinderea de pe fibrele gliale Bergmann, celula îşi schimbă forma corpului celular, devenind din fusiformă, sferică şi îşi reduce viteza de migrare de la 11.5 um/h la 3.8 um/h, în medie. Foarte interesant, după ce şi-a modificat morfologia corpului celular şi şi-a redus progresiv viteza de migrare, celula staţionează timp de peste 115 minute, după care îşi reextinde procesul de creştere şi reiniţiază migrarea, ieşind din stratul Purkinje şi îndreptându-se spre zona internă a stratului granular cu o viteză medie de 12.3 um/h. După ce ajung la destinaţie, celulele granulare îşi extind dendrite şi fac sinapse cu fibrele muşchioase şi axonii celulelor Golgi, dar îşi trimit şi axonii, perpendicular, în stratul molecular, unde formează fibre paralele care fac sinapsă cu dendritele mai multor celule Purkinje (pentru detalii despre circuitele cerebeloase, vezi: Henneman, 1974, pp. 728 – 730). Ceea ce demonstrează aceste cercetări este posibilitatea migrării celulelor atât cu suportul celulelor gliale, traversând stratul molecular gros de aprox. 110 um, cât şi independent de fibrele gliale Bergmann, pe o distanţă de aprox. 27 um + 113 um, traversând stratul Purkinje şi, respectiv, stratul granular intern (Komuro & Rakic, 1998). Această descriere infirmă, de asemenea, presupunerea că celulele granulare generate în stratul granular extern se opresc în stratul celulelor Purkinje pentru că, fără fibrele gliale, ele nu ar mai putea migra decât pasiv. Mai mult, încă un fapt ne atrage atenţia: celulele nou generate migrează, de data aceasta spre interior, printre celulele generate mai timpuriu, principiu pe care l-am detaliat şi în cazul migrării neuronilor corticali. Să reţinem că migrarea radială a celulelor granulare din cerebel se poate face şi fără suport glial.

Ce factori influenţează migrarea neuronilor granulari prin scoarţa cerebeloasă? Dat fiind complexitatea problemei, să o abordăm „de departe". Am notat că celulele Purkinje, odată ajunse în stratul granular intern, fac sinapsă cu fibre muşchioase, proiecţii ale olivelor bulbare, şi cu axonii celulelor Golgi. J. Hamori (1969) a arătat că deprivarea de fibrele muşchioase perturbă migrarea celulelor granulare. De curând, această relaţie a fost investigată mai atent. Fibrele muşchioase se pare că eliberează un neurotransmiţător excitator, glutamatul, care modifică influxul de Ca^{2+}, scăzând concentraţia acestuia în celula granulară (Rossi & Stater, 1993). Komuro şi Rakic (1992, 1993, 1996) au arătat că deprimarea *in vitro* a

influxului de Ca2 + la celulele granulare corelează cu reducerea vitezei de migrare a acestora. Acţiunea glutamatului asupra migrării celulelor granulare ar putea fi mediată de receptorii v-metil-D-aspartat (NMDA), care, dacă sunt blocaţi, se observă o scădere a migrării celulelor la preparate crude, iar, dacă sunt supraactivaţi, migrarea celulelor granulare este stopată (Komuro & Rakic, 1993;

124

Marret, Gressens & Evrard, 1996). Factorii care influenţează migrarea neuronală în cerebel sunt o* temă care trebuie, în continuare investigată. Am văzut că eliberarea unui neurotransmiţător de către terminalele postsinaptice care aşteaptă sosirea celulelor granulare este un semnal difuzibil care influenţează migrarea. Este probabil ca celula, după ce a pătruns în stratul Purkinje, schimbându-şi forma şi staţionând pentru o perioadă destul de lungă, să aştepte semnalul biochimic care să o ghideze către terminalul postsinaptic. Acesta este unul din mecanismele migrării neuronale fără ghid glial.

SGE
SM
Celulă Purkinje
Celule granii postau gri
SCP
SGI
ŞI

Fig. 3.6 *Traseul şi etapele migrării celulelor granulare de-a lungul diferitelor straturi ale scoarţei cerebeloase. Stadiile migrării sunt notate cu cifre (1 – 7).* SA, substanţă albă; SCP, strat al celulelor Purkinje; SGE, strat granular extern; SGI, strat granular intern; SM, strat molecular. (Modificat după Komuro & Rakic, 1998)

Aşa cum am menţionat, cortexul este organizat pe straturi şi coloane sau unităţi radiale care primesc inputuri şi servesc funcţii similare (Mountcastle, 1997). Dat fiind rolul celulelor gliale radiaie în stabilirea acestor coloane, unul din modelele care încearcă să explice corticogeneza se numeşte modelul unităţilor radiaie (Rakic, 1988, 1995 b; dar şi: Rakic, 1990). „Ipoteza unităţii radiaie", aşa cum o citează autorul ei, susţine că unităţile radiaie funcţionale se stabilesc prin proliferarea precursorilor din zona ventriculară, celulele provenite din acelaşi progenitor, care sunt, deci, înrudite clonai, migrând pe aceeaşi platformă glială radială. Reţeaua de celule gliale

radiaie determină celulele înrudite clonal să migreze şi să se agrege într-o singură coloană sau unitate radială. Deci coordonatele tangenţiale (orizontale) ale unei celule corticale depind de poziţia precursorului în zona ventriculară, iar locaţia radială (verticală) a unei celule este determinată de momentul generării: cu cât data naşterii unei celule este mai timpurie, cu atât aceasta se va agrega într-un strat mai profund. Conform acestei teorii, numărul de unităţi radiaie determină mărimea suprafeţei corticale, în timp ce

numărul de celule dintr-o coloană determină grosimea corticală. Predicţia acestui model se verifică pentru că explică datele de volumetrie comparativă care au constatat că, în timpul evoluţiei, la mamifere, cortexul s-a extins de aproape 1.000 de ori fără însă a se înregistra o creştere semnificativă a grosimii sale. Modelul unităţii radiale explică acest fapt prin modificarea activităţii proliferative a progenitorilor din zona ventriculară înainte de neurogeneză, atunci când se formează celulele gliale radiale (celulele gliale se formează, în general, după terminarea neurogenezei, dar celulele gliale radiale fac excepţie). Astfel, creşte numărul platformelor gliale/unităţilor radiale fără însă a creşte semnificativ numărul de neuroni din fiecare unitate (Fig. 3.7; Rakic, 1995 a, b).

Până de curând, modelul unităţii radiale şi migrarea radială erau acceptate ca regulă pentru dezvoltarea cortexului cerebral. Regulile (Lt = f (în) şi Lv = f (la), unde Lt, v sunt locaţiile tangenţiale, respectiv, verticale; în momentul generării celulei clonale n; la, locaţia progenitorului în zona ventriculară) stabilesc funcţiile identităţii unei celule corticale. Conceptul de „origine clonală a unei unităţi radiale" a dovedit putere explicativă însă o serie de cercetări din ultima perioadă au arătat că migrarea radială nu este singura regulă a migrării neuronilor în corticogeneză. Un corolar al modelului unităţii radiale este că identitatea celulelor izocortexului

Zonă marginală Placă corticală
Proces cetidurătoi
Proces al celulei gualeradiale
Proces terminal

Fig. 3.7 *Celulele gliale radiale şi migrarea neuroblaştilor. Corpul celulelor gliale radiale se găseşte în zona ventriculară, iar procesele lor se extind spre suprafaţa externă.* SVZ, zonă subventriculară; VZ, zonă

ventriculară. (Modificat după Cowan, 1979)

126

este stabilită în zona ventriculară, prin originea clonală şi momentul generării. Ipoteza a fost numită ipoteza protohărţii şi pune regulile proliferării şi migrării neuronale la baza specificării ariilor corticale (harta funcţională). Ceea ce vrem să accentuăm este generalizarea unei observaţii privind celulele gliale radiale la principiul migrării neuronale, apoi la modelul unităţii radiale prin care se oferă o ipoteză a evoluţiei izocortexului şi, ca şi corolar, la teoria protohărţii care propune o explicaţie a stabilirii hărţii funcţionale a izocortexului. Studii care ar fi arătat că migrarea neuronală nu este o regulă atât de generală în corticogeneză ar fi avut, deci, impact asupra unor direcţii de cercetare importante din biologia celulară, neuroembriologie şi chiar neurofiziologie. Aşa se explică de ce aceste cercetări, deşi nu dovedeau un lucru nou, au avut o audienţă deosebită în comunitatea neuroştiinţelor.

Pe scurt, unele studii au arătat că dispersia clonelor este mult mai extinsă decât prezice modelul unităţii radiale. Prin migrare de tip non-radial, migrare denumită tangenţială, cu referinţă la aspectul de migrare în lanţ a neuronilor, celule înrudite clonal se pot distribui în regiuni citoarhitectonice foarte îndepărtate. Aceste studii au profitat de apariţia unei noi metode, aceea a studierii traseului unei celule prin vectori retrovirali care au fost modificaţi pentru a nu se putea replica, dar care codează o genă (de pildă, gena fosfatazei alcaline) a cărei exprimare într-o celulă asigură un marker histochimic al acesteia. C. Walsh şi C.L. Cepko (1992, 1993) şi N.A. O'Roiârke şi colaboratorii (1992, 1995) au arătat iniţial că celule înrudite clonal sunt prezente în diferite arii ale cortexului cerebral. Autorii interpretau aceste date ca pe o probă a migrării tangenţiale. Se ştia că, de pildă, celulele din zona intermediară nu respectă în migrare platformele gliale radiale. Dar, într-o cercetare mai recentă, aceiaşi autori oferă o interpretare diferită. Ei susţin că aceleaşi date pot fi explicate prin dispersia în zona ventriculară a clonelor, care sunt „deraiate" pe o altă platformă glială radială şi se vor agrega, deci, în coloane diferite. Modelul pe care îl propune Walsh, în acord cu un corp substanţial de date experimentale, susţine că, în cortexul cerebral există două tipuri de clone corticale: unele care formează grupuri solidare de celule în cortex şi altele care îşi distribuie neuronii pe distanţe mai mari de 1.5 mm (Reid, Liang &

Walsh, 1995). Dinamica necanonică a acestui al doilea tip de celule se poate explica şi prin dispersia laterală a progenitorilor în zona ventriculară, nu numai prin migrarea lor tangenţială. Într-un comentariu relativ recent, P. Rakic sintetizează situaţia probelor experimentale şi, în acelaşi timp, atitudinea unei mari părţi a comunităţii ştiinţifice faţă de controversa migrării neuronale gliale şi tangenţiale:

„În timp ce semnificaţia alocării radiale de neuroni a fost propusă atât pentru dezvoltarea corticală ontogenetică, cât şi filogenetică, rolul clonelor dispersate în telencefal este mai puţin clar. Din cauză că fracţiunea de celule dispersate este relativ mică, ar putea reflecta imperfecţiunea mecanismului biologic implicat în migrarea celulară. Alternativ, o parte din aceste celule ar putea servi un rol specializat". (Rakic, 1995 a, pp. 11327)

127

Studii foarte recente documentează două tipuri de migrare radială: translocarea somală, a corpului neuronal, caracteristică neuronilor generaţi timpuriu şi locomoţia ghidată de celulele gliale, migrare mai specifică celulelor piramidale. Aceste tipuri de migrare au fost discutate mai demult (Fig. 3.7). D.K. Morest (1970) observase că neuroblaştii tineri care se îndreaptă spre placa corticală îşi pierd conexiunile cu suprafaţa ventriculară şi îşi translocă pericarionul de-a lungul unor procese orientate radial, care se întind până la suprafaţa piaţă. El a numit acest proces de migrare „translocare pericarionică". Observaţiile acestuia au fost confirmate de P.A. Brittis şi colaboratorii (1995). Cu toate acestea, rezultatele lui Morest nu au atras atenţia, mai favorizată fiind ipoteza migrării cu ajutorul celulelor gliale radiale, a lui Rakic. Metode imagistice dezvoltate recent au permis însă descrierea a doua tipuri de migrare: translocare pericarială, în cazul neuronilor generaţi timpuriu, când cortexul cerebral este încă subţire şi migrarea cu ajutorul celulelor gliale, în fazele mai târzii ale corticogenezei, când neuroblaştii trebuie să

A'V!
I
C!
S
4
DY

I

Fig. 3.8 *Migrarea neuronală în dezvoltarea creierului. (a) Secţiune prin creierul şobolanului. Tipuri de migrare: (a) modelul lui Berry şi Rogers: după mitoză, nucleul unei celide-fiice migrează către placa corticală cu ajutorul procesului celulei gliale radiale, iar cealaltă celulă-fiică rămâne în zona ventriculară; (B) modelul lui Morest: neuroblaştii îşi pierd barele terminale şi îşi translocă corpul celular cu ajutorul unor procese gliale radiale ce se termină la nivelul suprafeţei piale; (C) modelul lui Rakic: neuroblaţii folosesc celulele gliale radiale ca pe o platformă pentru a migra în placa corticală; (D) Modelul lui Nadarajah: translocarea somei este modul predominant de migrare în timpul corticogenezei timpurii, iar migrarea ghidată glial predomină în stadii mai târzii ale corticogenezei,* EGL, EGM, eminenţe ganglionare laterală şi mediană; VI, ventriculi laterali. (Modificat după Nadarajah & Parnavelas, 2002)

traverseze mai multe straturi dense în celule (Nadajarah & colab., 2001). Celulele care migrează prin translocare pericarială au un proces bazai ce se termină pe suprafaţa piaţă şi un proces posterior scurt. Aceste celule avansează continuu, cu o viteză de migrare mai mare decât în cazul migrării ghidate glial. Celulele care migrează pe platforme gliale au un proces bazai mai scurt şi au un comportament

migrator saltatoriu, cu staţionări şi reiniţieri ale migrării (vezi: mai sus), deci, şi o viteză de migrare mai mică (Nadajarah & Parnavelas, 2002).

Care este mecanismul celular al migrării? Am văzut că migrarea presupune modificarea formei corpului celular, precum şi extinderea şi retragerea unor procese de creştere. În celulă, nucleul suferă şi el migrare în diferite locaţii intracitoplasmatice. De pildă, atunci când nucleul se mişcă către capătul anterior al celulei, aceasta are un proces pionier mai scurt şi un proces posterior mai lung. Migrarea nucleului este un proces susţinut de reorganizarea microfâlamentelor şi microtubuiilor. Un studiu elegant al lui Rakic şi al colaboratorilor a demonstrat cum mecanismul reorganizării microtubuiilor contribuie la migrarea neuronală (Rakic, Knyhar-Csillik & Csillik, 1996). Analize electronmicroscopice au indicat prezenţa unor linii paralele de microtubuli în procesele pionier şi posterior, imediat ce celula începe

să migreze. Premisa implicării microtubuiilor în migrarea neuronală este formulată sintetic de autorii citaţi mai sus:

„Pare verosimil ca o forţă mecanică considerabilă care include o rearanjare a platformei citoscheletice să fie un prerechizit exenţial pentru această translocare, din moment ce întregul corp celular este propulsat prin stratul molecular în dezvoltare, o arie care este împachetată dens cu procesele celulare ale neuronilor generaţi mai timpuriu". (Rakic, Knyhar-Csillik & Csillik, 1996, pp. 9218)

Dinamica microtubuiilor a fost analizată în patru compartimente citoplasmice ale celulei granulare imature: procesul pionier, procesul posterior, conul de creştere şi fibrele paralele. Microtubulii din neuroni sunt formaţi din molecule de tubulină a şi p\ polimerizaţi sub forma unui tub. În migrarea neuronală, importantă pare să fie polaritatea microtubuiilor, adică modul şi capătul în care sunt adăugaţi polimeri de tubulină atunci când microtubulii se reorganizează: polimerii de tubulină se adaugă întotdeauna la un capăt numit pol pozitiv şi, simultan, la polul negativ, sunt înlăturaţi polimeri. Studierea electronmicroscopică a arătat că procesul pionier al celulei granulare are o citoplasmă densă ce conţine pe lângă microtubuli organite cum ar fi mitocondriile, aparatul Golgi, reticul endoplasmatic şi ribozomi. Procesul posterior are un diametru mai mic şi conţine o citoplasmă mai clară, cu numeroşi microtubuli. Majoritatea microtubuiilor o95%) din procesul pionier au polul pozitiv către vârful de creştere al procesului. Astfel, Rakic şi colaboratorii sugerează că adăugarea de noi polimeri la polul pozitiv al microtubulilor, spre vârful procesului de creştere, şi dezmembrarea polimerilor a polul negativ, în faţa nucleului celulei, ar putea crea forţa de propulsie pentru migrarea celulei, respectiv, ar elibera compartimentul citoplasmic imediat anterior faţă de nucleu pentru a permite înaintarea acestuia (Rakic, Knyhar-Csillik & Csillik, 1996).

Această ipoteză provocatoare este susţinută indirect de date experimentale. În primul rând, rata creşterii lineare a microtubulilor corespunde ratei migrării neuronale (10 – 15 um/h). În al doilea rând, se explică de ce extensia lentă a procesului de creştere este urmată de migrarea rapidă a nucleului: este necesară o perioadă mai lungă pentru a „înghesui" polimeri la polul pozitiv al microtubulilor.

129.

Iar, odată eliberat compartimentul anterior faţă de nucleu,

acesta poate să migreze rapid. Apoi, teoria explică şi de ce perioadele de migrare a nucleului sunt urmate de perioade de staţionare, comportament specific migrării radiale. Foarte plastic, Rakic şi colaboratorii spun că dacă extinderea procesului pionier corelează cu o fază de asociere („salvare") la nivelul microtubulilor, migrarea nucleului reflectă o fază de disociere a microtubulilor („catastrofa") (Rakic, Knyhar-Csillik & Csillik, 1996). Din nou, teoria are putere explicativă: nucleul nu poate migra pentru că este. arestat de citoschelet; odată cu reorganizarea microtubulilor, nucleul este „deshămat" şi poate migra spre procesul de creştere. Fără a fi un argument experimental, noi adăugăm convingerea, probată de multe ori în istoria neuroştiinţelor, ca şi altundeva, că viaţa biologică nu permite atavisme, altfel spus, totul are o funcţie, iar, când aceasta nu mai este utilă pentru adaptarea organismului la mediu, mecanismul care susţinea respectiva funcţie nu persistă, ci este remodelat pentru o nouă funcţie! Şi ca să provocăm reflecţia în acest sens, să notăm că rata de polimerizare a microtubulilor depinde de concentraţia Ca^{2+} citosolic, a cărui fluctuaţie, aşa cum am văzut, poate fi influenţată şi de neurotransmiţătorul eliberat de terminalul postsinaptic.

Migrarea neuronală depinde şi de semnale receptate prin contact celular. S-a arătat astfel că molecule prezente pe membranele celulelor din diferite straturi corticale direcţionează procesele tangenţiale pe care celulele din aceste straturi şi le extind, ajutând procesele să respecte limitele laminare. Deci, neuronii dintr-un strat cortical controlează specificitatea laminară a circuitelor corticale prin molecule prezente pe membrană (pentru detalii, vezi: Castellani & Bolz, 1997). De pildă, axonii celulelor ganglionare din retină îşi trimit procese către chiasma optică, pe suprafaţa ventrală a diencefalului, apoi, de aici, tracturile optice proiectează spre nucleii geniculaţi laterali, traversând diencefalul pe un traseu dorso-caudal. Axonii cresc spre talamus, dar nu şi spre epitalamus şi hipotalamus, deci, există o ghidare a acestui tract către ţinta talamică potrivită. Această specificitate poate fi explicată prin prezenţa pe membrana celulelor din epitalamus şi hipotalamus, mai ales la limitele talamus/epitalamus şi talamus/hipotaiamus, a unor molecule, cum ar fi neurocan şi tenascina, care inhibă creşterea axonilor şi fasciculaţia. Mai ales celulele de la nivelul zonei limitante intertalamice, care exprimă molecule specifice plăcii podelei, cum ar fi SHH, reprimă creşterea

tracturilor optice, adăugând, deci, un semnal difuzibil moleculelor represoare de pe membranele celulelor din epitafamus şi hipotalamus (Tuttle & colab., 1998).

O altă perspectivă asupra migrării neuronale o oferă tulburările în care acest proces este incriminat şi modelele experimentale de care dispunem. Migrarea neuronală poate fi împărţită în trei faze. În prima fază, o celulă postmitotică, adică un progenitor neuronal sau un neuroblast, iese din zona ventriculară, se asociază cu o celulă glială radială şi formează astfel o axă de polaritate faţă de suprafaţa ventriculară; în următoarea etapă, neuronul migrează pe platforma glială. În fine, neuronul ajunge la destinaţie şi răspunde la semnalele mediului celular desprinzându-se de pe ghidul glial şi continuându-şi diferenţierea (Nowakowski, 1996; vezi, de asemenea, Gleeson & Walsh, 2000). Dacă este perturbată migrarea

neuronală neuronii poziţionaţi anormal se numesc heterotopici (Rakic, 1975 a, b). Teoretic, există patru posibilităţi prin care pot apărea neuroni heterotopici: (a) axoni ai unor celule poziţionate corect proiectează către ţinte care nu s-au format sau sunt plasate ectopic; (b) axoni ai unor celule poziţionate corect proiectează pe un traseu atipic ajungând însă la ţinta corectă; (c) axoni ai unor neuroni heterotopici proiectează către ţintele corecte; (d) axoni ai unor neuroni heterotopici proiectează către ţinte atipice. Cel mai bine documentat model animal al tulburărilor de migrare este un şoarece mutant numit REELER, al cărui fenotip caracterizat de tremor, distonie şi ataxie. are la origine o mutaţie spontană care a fost izolată acum câteva decenii (pentru o sinteză, vezi: Caviness & Rakic, 1978). La REELER, cerebelul are defecte de morfogeneză, iar poziţia neuronilor corticali este inversată, astfel că straturile se formează dinafară spre înăuntru. Mai târziu, screeninguri ale unor alte linii de şoareci la care apar mutaţii spontane au dus la descoperirea mutantului SCRAMBLER, cu defecte corticogenetice identice cu ale fenotipului REELER (Sweet. & colab., 1996). La REELER, axonii celulelor corticale poziţionate greşit reuşesc să proiecteze normal, modificându-şi traseul proiecţiei (posibilitatea teoretică 3) (Stanfield, Caviness & Cowan, 1979). Astfel, de pildă, în cortexul vizual, celulele prezintă câmpuri receptoare tipice, ceea ce indică faptul că ele procesează corect informaţia vizuală (pentru detalii, vezi: Pearlman, 1985; Lemmon & Pearlman, 1981).

Această modificare compensatorie a traseului proiecţiei neuronilor poziţionaţi greşit nu se întâmplă în tot creierul; axonii tractului olfactiv lateral, de exemplu, proiectează după traseul tipic pentru creierul normal, ceea ce face ca ei să nu facă sinapsă cu ţinta corectă (posibilitatea teoretică 1) (Devor, Caviness & Derer, 1975).

Această mutaţie ne permite să revenim pentru a clarifica problema diferenţei dintre cortexul mamiferelor şi cortexul reptilelor. REELER are un izocortex cu şase straturi (+ stratul VIB specific rozătoarelor) ca al tuturor mamiferelor, dar straturile se formează după o secvenţă similară cu cea de la reptile. Acest fapt este explicat de incapacitatea celulelor care trebuie să formeze placa corticală de a migra printre celulele preplăcii care se formează normal. Imediat după naştere, majoritatea celulelor preplăcii mor, placa corticală ajungând astfel să fie localizată imediat sub. suprafaţa piaţă. S-a demonstrat că o genă situată pe cromozomul 5, care codează o glicoproteină denumită *reelin* este responsabilă de fenotipul REELER (pentru o sinteză, vezi: Curran & D'Arcangelo, 1998). Gena *Reelin* este controlată în timpul corticogenezei de gena *Emx 2* care, aşa cum am văzut în capitolul anterior, este un marker palial (Mallamaci & colab., 2000). Gena *Reelin* este exprimată în celulele Cajal-Retzius şi în neuronii granulari subpiali din zona marginală. Au fost identificaţi doi receptori de mare afinitate pentru *reelin,* este vorba de receptorul 2 pentru apolipoproteina E *(Apoeri)* şi receptorul pentru *Vldl* (pentru detalii, vezi: Gleeson & Walsh, 2000). Deleţia concurentă a genelor care codează aceşti receptori recapitulează fenotipul REELER. Fiind secretată de celulele preplăcii şi de celulele zonei marginale, rolul acestei proteine a fost interpretat ca semnal de oprire a migrării neuroblaştilor şi al decuplării lor de pe suportul glial. Celulele care migrează cu ajutorul celulelor gliale radiale, odată

ajunse în contact cu-celule care secretă *reelin* se decuplează şi eliberează ghidul glial astfel încât o altă celulă, generată după aceea, să poată folosi acelaşi substrat pentru migrare (vezi: Pinto-Lord, Evrard & Caviness, 1982). Aceasta explică secvenţa dinăuntru în afară după care sunt generaţi neuronii corticali. În cortexul REELER, din cauza absenţei semnalului de separare faţă de ghidul glial, celulele migrează până ajung la suprafaţa subpială sau un strat celular format mai timpuriu.

Un alt factor de semnalizare necesar pentru capacitatea celulei de a traversa straturi deja formate este o kinază, Cdk5 şi factorul său activator specific neuronal, p35, ambii prezenţi în celulele corticale care migrează (Kwon & Tsai, 1998). Cdk5 este implicată în procese de reglare a ciclului celular, diferenţiere neuronală, fasciculare. Ele interacţionează cu o enzimă cu acţiune GTP-azică din familia Ras, numită rho GTP-ază, ambele având rol în polimerizarea actinei, componentă a microfilamentelor (Nikolic & colab., 1998). Aceasta sugerează o relaţie cu reorganizarea citoscheletului în timpul migrării celulare, putând acţiona şi asupra microtubulilor prin fosforilarea unor proteine asociată microtubulilor, cum ar fi tău sau MAP-2 (Nakayama & colab., 1999). Există ipoteze că semnalizarea *reelin* are acţiune de a reduce Cdk5/p35, promovând astfel adeziunea celulară şi stopând migrarea celulei (Homayouni & Curran, 2000).

La începutul acestui paragraf atrăgeam atenţia că zona ventriculară dorsală nu este singura sursă de neuroni corticali. Se credea până de curând că zona ventriculară dorsală dă naştere la neuronii izocortexului, în timp ce zona ventriculară ventrală, sub forma unei ridicături care deformează cavitatea ventriculară, produce neuronii care vor popula striatumul şi pallidumul. Zona ventriculară ventrală este (împărţită de un sulciis în două zone proliferative: eminenţa ganglionară laterală şi eminenţa ganglionară medială. Diferenţele dintre izocortex şi compartimentul striato-paiidai păreau să susţină că aceste două zone proliferative generează neuroni numai pentru striatum şi pallidum; cele două compartimente sunt despărţite printr-un important sulcus corticostriat, apoi, între izocortex şi striatum există diferenţe moleculare şi morfologice, primul fiind organizat în şase straturi, iar cel de-al doilea fiind organizat mai ales sub formă de nuclee. În plus, există cercetări care susţineau că progenitorii neuronali sau neuroblaştii nu pot traversa sulcusul corticostriat, ceea ce ar proba originea exclusivă în zona ventriculară dorsală a neuronilor izocorticali (Neyt & colab., 1997). Studii mai recente arată însă că această observaţie nu este corectă pentru că neuronii din eminenţa ganglionară laterală pot depăşi sulcusul corticostriat şi pot migra în izocortex.

Echipa lui F. Valverde a abordat problema originii neuronilor din cortexul olfactiv primar, situat în partea ventroiaterală a telencefalului, despre aceştia presupunându-se că ar proveni din zona

ventriculară dorsală sau din eminenţele ganglioiiare sau din ambele zone germinative. Ei au demonstrat că eminenţa ganglionară laterală generează celule care pot migra către cortexurile din partea ventroiaterală a telencefalului, cum ar fi în stratul II al cortexului olfactiv primar, dar, posibil, şi către cortexurile periamigdaloid şi perirînal (pentru anatomie, vezi: Amarai & colab., 1992, pp. 1 – 66). În partea ventroiaterală a telencefalului există

fibre gliale în formă de „S" care oferă un suport pentru migrarea tangenţială a celulelor din eminenţa ganglionară laterală. Un număr mare de celule migrează cu ajutorul acestor suporturi gliale şi ajung chiar şi preplaca izocorticală (De Carlos „opez-Mascaraque & Valverde, 1999). Deci, dacă sulcusul corticostriat nu este o barieră pentru celulele corticale, este posibil ca şi alte celule de la nivelul crainenţelor să contribuie la corticogeneză. Echipa lui J.G. Pamavelas a susţinut de curând această presupunere dovedind că celule din eminenţa ganglionară medială asigură interneuroni care migrează şi se agregă în zonele marginală şi intermediară din izocortex (Lavdas & colab., 1999).

Fig. 3.9 *Migrarea – ventricular-ghidată. Migrarea interneuronilor de la nivelul eminenţelor (EGL, EGM, eminenţe ganglionare laterală şi medială) prin zona intermediară evită semnalele chemorepulsive care este posibil să fie emise de placa corticală (PC) şi se ghidează după semnalele chemoatractante emise, probabil, în zona ventriculară (ZV).* (Modificat după Nadarajah & Pamavelas, 2002)

Dar cum ajung aceşti interneuroni care migrează din zona ventrală a telencefalului să migreze corect şi să facă sinapsă cu neuronii piramidali izocorticali corespunzători? revenim la migrarea celulară. S-a arătat că şi aceşti interneuroni migrează tot într-o secvenţă „dinăuntru în afară", ceea ce indică faptul că ei ar răspunde la aceleaşi semnale ca şi neuronii care au populat straturile

I izocorticale. Dar, imediat după ce sunt generaţi în eminenţa ganglionară laterală, aceşti neuroni migrează tangenţial de-a lungul ventriculilor până ajung în zona

I ventriculară dorsală. Acest fapt a atras atenţia şi se presupune actualmente că semnale prezente în zona ventriculară ar ghida celulele până în partea dorsală a elencefalului unde se îndreaptă către straturile corticale cu ajutorul celulelor gliale adiale. Acest tip nou de

migrare neuronală de-a lungul zonei ventriculare a fost numit migrarea ventricular-ghidată (Fig. 3.9; Nadajarah & colab., 2002).

Sigur, neurogeneza este o lecţie frumoasă, dar complicată de neuroştiinţe. iste, totodată, una din problemele elucidate prin metode clasice, cum ar fi metoda

133

Golgi sau autoradiografia, care au impus cele mai merituoase nume în neurobiologia celulară, cum ar fi P. Rakic, F. Valverde, J.G. Parnavelas, ca să îi menţionăm numai pe conducătorii celor mai cunoscute laboratoare. Tema a suscitat şi mai mult interes odată cu descoperirea continuării neurogenezei în creierul adult. Mai mult, studii foarte elegante din ultima perioadă au arătat o relaţie clonală dintre celulele gliale radiale şi neuroni. Un studiu recent arată, de pildă, că celulele gliale radiale şi neuronii care migrează şi se agregă într-o coloană corticală par să fie generaţi din aceeaşi populaţie de precursori din segmentul de zonă ventriculară de la baza unităţii radiale (Noctor & colab., 2000). Deci, ipoteza expansiunii corticale prin înmulţirea numărului de unităţi radiale pare să primească noi argumente. Mai mult celulele gliale se pare că se pot transforma în neuroni, existând unele sugestii cum că acestea ar fi, de fapt, progenitori bipotenţiali (vezi, de ex.: Chanas-Sacre & colab., 2000; Alvarez-Buylla, Theelen & Nottebohm, 1990; Malatesta, Hartfuss & Gotz, 2000; pentru o discuţie, vezi: McKay, 1989). Nu putem trece peste aceste controverse. Domeniul volumului nostru este dezvoltarea sistemului nervos, temă care, interpretată canonic, înseamnă dezvoltare embrionară plus câteva luni de dezvoltare neuronală postnatală. Tendinţa iniţiată de un val de studii recente este de a reconsidera accepţiunea termenului de dezvoltare (vezi, de pildă: Gage, 2002). Atât timp cât neurogeneza, chiar dacă nu la proporţiile celei prenatale, se întâmplă şi în creierul adult sau senescent, se cheamă că acel creier se dezvoltă. Sub acest unghi, oferim drept premiu spre sfârşitul acestui capitol o expunere provocatoare şi exotică despre precursorii neuronali, neurogeneza adultă, terapia celulară şi biotehnologie. În continuare, însă, vom aborda un alt set de date experimentale care încearcă să stabilească natura factorilor care participă la corticogeneză.

3.2 Formarea hărţii funcţionale a cortexului cerebral

După organizarea sa tangenţială şi radială, cortexul cerebral

devine regionalizat în arii distincte ca citoarhitectură, conexiuni şi funcţie; ca să luăm numai clasificarea cea mai generală, apar arii senzitive şi motorii primare (Fig. **3.10).** Mecanismul prin care este specificată această hartă funcţională a cortexului poate să cuprindă factori genetici, neuroembriologia moleculară indicând specificitatea anumitor gene pentru unele arii corticale; sau factori epigenetici, cum ar fi maturarea aferentelor şi acţiunea inputurilor senzoriale venite prin acestea; sau ambele tipuri de factori.

Am văzut că P. Rakic propune un model al protohărţii, considerând că ţinta tangenţială şi radială a celulelor corticale este specificată încă din zona ventriculară, în funcţie de momentul şi locaţia populaţiei de progenitori (Rakic, 1988). Alte modele, care şi ele au la bază probe experimentale, pun accent pe importanţa aferentelor talamocorticale în formarea hărţilor senzoriale corticale. Cel mai cunoscut model, numit modelul protocortexului, este propus de D.D.M. O'Leary care susţine că celulele cortexului cerebral sunt iniţial naive, omogene, specificarea ariilor funcţionale fiind dependentă de aferentele de la talamus, idee lansată de O.D. Creutzfeld în anii '70 (Creutzfeld, 1977; O'Leary, 1989). Sigur, în

ultimă instanţă, este verosimil să considerăm că cele două teorii sunt complementare, modelul protohărţii acceptând importanţa aferentelor care au rolul de a modifica şi rafina harta funcţională, iar modelul protocortexului fiind confruntat, mai ales în ultimul timp, cu un val de cercetări care documentează importanţa specificării genetice a ariilor corticale (vezi: O'Leary & Nagakawa, 2002; Pallas, 2001). Dovezile experimentale sunt însă dezbătute.

Fig. 3.10 *Harta funcţională a cortexului cerebral în care sunt prezentate: A, ariile senzitive (ŞI, 2, ariile somestezice 1 şi 2; VI, cortex vizual primar) şi B, motorii primare (Mi, aria motorie primară), precum şi C, porţiuni din alocortex (Hip, hipocamp; Pir, cortex piriform). A, B, C, vedere medială, dorsală, respectiv, laterală a telencefaiului.* BO, bulb olfactiv. (Modificat după Ragsdale & Grove, 2001)

3.2.1 Factori intrinseci în regionalizarea cortexului cerebral

Numeroase studii au documentat stabilirea expresiei distribuite spaţial a unor gene, înainte de sosirea aferentelor, ceea ce ar sugera că factori intrinseci ghidează asocierea dintre celule învecinate şi ar putea avea un rol chiar şi în semnalizarea şi ghidarea aferentelor către

ţinta corectă. De aici rezultă că, înainte de sosirea aferentelor talamocorticale, cortexul cerebral este constituit din populaţii eterogene de celule. Teza se probează: o mare parte din cele 165 de zile de gestaţie de la maimuţa Rhessus este alocată morfogenezei diferitelor structuri nervoase; în această perioadă, deci, sunt generate celule corticale în absenţa unei legături între talamus şi cortex, ceea ce pare să indice împărţirea corticogenezei în două etape: una, controlată prin factori genetici şi cea de-a doua, care angajează mai ales acţiunea aferentelor talamocorticale (Rakic, 1976, 1977 a, b).

Au fost identificate numeroase molecule ale căror gene sunt exprimate de neuroni din zone discrete ale cortexului cerebral. Un din primele astfel de molecule descrise este proteina LAMP *(lymbic sistem-associated membrane protein),* specifică cortexurilor perirânal, cingulat şi prefrontal (Levitt, 1984; Horton & Levitt, 1988). Celulele care exprimă LAMP stimulează creşterea unor neuroni prelevaţi din zone ale cortexului limbic, dar nu şi a neuronilor din cortexurile somato-senzitiv sau vizual, fapt care indică funcţia LAMP de a semnaliza recunoaşterea şi cablarea circuitelor limbice (Mann & colab., 1998). Gena unei alte proteine, latexina, este exprimată în zonele laterale, dar nu dorsale, ale cortexului, mai ales într-o populaţie de neuroni excitatori din stratul VI care formează

conexiuni cortico-corticale (Ariraatsu & colab., 1992, 1994). Cele două molecule sunt exprimate diferenţiat încă din zona ventriculară, astfel că dacă progenitorii din porţiunile limbice/non-limbice sau cele destinate cortexului lateral/dorsal sunt plasate în aceeaşi cultură, celulele vor exprima molecula specifică. Aceste experimente indică faptul că exprimarea unor molecule areal-specifice rezultă prin chiar procesul de diferenţiere a progenitorului. M. Cohen-Tannoudji şi colaboratorii au identificat un construct transgenic (H-2Z1), adică o genă clonată şi modificată astfel încât să poată exprima un marker, care este exprimat în celulele din stratul IV al cortexului somato-senzitiv (Cohen-Tannoudji, Babinet & Wassef, 1994). Mai recent, s-a arătat că factorul de transcripţie *Otx-2* este exprimat în celulele din stratul IV şi/sau V din cortexul vizual al rozătoarelor (Nothias, Fishell & Ruiz y Altaba, 1998).

Alte molecule exprimate în regiuni limitate ale cortexului cerebral sunt *TBr-l,* în straturile superficiale ale cortexului, într-un

gradient rostral-caudal de densitate a celulelor care îl exprimă, *Fgf-l,* a cărui expresie este relativ limitată. În regiunile din care se vor forma cortexurile parietal şi frontal şi factori de transcripţie ca *Lhx-2* şi *Emx-l* (pentru o sinteză, vezi: O'Leary & Nagakawa, 2002; Levitt, Barbe & Eagleson, 1997, precum şi capitolul anterior). Şi expresia căderinelor este distribuită spaţial, astfel că, de exemplu, căderina-6 este exprimată după un gradient cortical lateral-medial, cu o expresie marcată în cortexul auditiv, iar căderina-8 poate discrimina cortexul motor şi vizual de restul izocortexului (Nagakawa, Johnson & O'Leary, 1999). În alocortex, formarea straturilor hipocampului depinde de expresia *Emx-2,* în absenţa acesteia girusul dinţat neputându-se forma, iar cornul lui Amtnon fiind hipotrofic (Pellegrini & colab, 1996). Mai mult, încă de la începutul formării sale, câmpurile cornului lui Ammon pot fi identificate prin expresia specifică a unor macromolecule: câmpurile CAI şi CA3, „cu citoarhitectonică diferită, primul conţinând neuroni piramidali mici, iar cel de-al doilea câmp fiind populat cu neuroni piramidali mari, exprimă foarte specific *SCIP* şi *KA1.* Identitatea dintre regiunile delimitate molecular şi câmpurile funcţionale mature CAI şi CA3 este perfectă! (Tole, Christian & Grove, 1997) Un alt studiu recent arată că *Otx-l* marchează celulele din zona ventriculară, iar gena *Svetl* este specifică zonei subventriculare (Fig. 3.11). Pe baza acestei discriminări moleculare ale celor două zone germinative, autorii au oferit dovezi preliminare pentru generarea celulelor straturilor corticale profunde (V-VI) în zona ventriculară şi a celor destinate straturilor corticale superficiale (II-III) în zona subventricuâară (vezi: Tarabykin & colab., 2001). Expresia R-caderinei şi N-caderinei este asociată maturării căilor talamocorticale, precum şi a unor eferenţe corticale, respectiv, proiecţii ale hipocampului, cortexului piriform şi complexului amigdalian (Obst-Pernberg, Medina & Redies, 2001; Redies & colab., 2000).

Distribuţia receptorului /? – adrenergic în celulele din subplacă poate diferenţia cortexul vizual primar de ariile vizuale secundare (Lidow & Rakic, 1994). Receptorul nicotinic 017 poate discrimina, pe parcursul unei perioade limitate de dezvoltare, cortexurile somato-senzitiv, vizual şi auditiv (Broide & colab., 1995). Se acceptă actualmente că regiunile corticale pot fi definite precis numai pe baza

unor combinaţii de gene pe care le exprimă celulele locale şi că

această combinaţie poate fi influenţată de prezenţa aferentelor talamocorticale. În această ultimă privinţă, la celulele din cortexul vizual cultivate în prezenţa unor celule prelevate din talamus, expresia *Otx-2* este marcată faţă de culturile de cortex vizual simplu. H-2Z1 nu mai este exprimat în cortexul somato-senzitiv dacă nucleii talamici care proiectează aici sunt extirpaţi în perioada neonatală (Nothias, Fishell & Ruiz y Altaba, 1998; Gitton, Cohen-Tannoudji & Wassef, 1999).

*, *

„În iii)

Fig. 3.11 *Domeniul de expresie al Svet-l în telencefalul şoarecilor normali (a) şi la şoarecilor REELER (B). Domeniul de expresie este evidenţiat cu capete de săgeată.* (Adaptat după Tarabykin & colab., 2001, cu permisiunea autorilor)

Alte cercetări au indicat expresia diferenţiată a receptorilor pentru efrine (Eph) în hipocamp şi în cortexul vizual. Această clasă de receptori include două tipuri de receptori (EphA şi B) şi două tipuri de liganzi (efrina-A şi B) (Comitetul Nomenclaturii Eph, 1997). Rolul lor în sistemul nervos nu este prea bine cunoscut. Se ştie, de pildă, că efrina-A5 inhibă fasciculareа şi creşterea axonilor corticaâi. Mai mult, cortexul exprimă efrina-A5 în zone specifice, iar neuronii din talamus exprimă diferenţiat receptorul Eph-A5; această relaţie face că axonii acestor neuroni talamici să proiecteze în zonele corticale prezise de expresia efrinei-A5 (Zhang & colab., 1996). Expresia efrinelor şi receptorilor lor diferă înainte şi după stabilirea conexiunilor talamocorticale şi corticotalamice, în funcţie de regiune şi strat (Donoghue & Rakic, 1999 a). De pildă, receptorii EphA3, A6 şi A7 sunt exprimaţi în zona din care se va forma cortexul vizual primar, dar nu şi în regiunea ariei extrastriate unde este exprimat EphA3, ceea ce sugerează că aceste molecule asigură un ghid pentru stabilirea circuitelor şi a sinapselor în cele două arii funcţionale (Donoghue & Rakic, 1999 b; pentru o sinteză, vezi: Sestan, Rakic & Donoghue, 2001).

Toate aceste probe experimentale demonstrează regionalizarea cortexului înainte de sosirea aferentelor talamocorticale. Această identitate moleculară ce diferenţiază celulele din diferitele viitoare regiuni funcţionale ale cortexului par să aibă rolul de mecanisme de atragere a aferentelor potrivite, dat fiind că se ştie că acestea au un traseu precis către ţintele corticale corecte încă din faze timpurii de

dezvoltare, de la ziua embrionară E16 la şobolan, de exemplu (Miller, Chou & Finlay, 1993; Gaillard & Roger, 2000). Deci, „decât [să considerăm] că aferentele

talamice regionalizează iniţial cortexul, [mai degrabă] un cortex regionalizat ar putea coordona creşterea aferentelor". (Ragsdale & Grove, 2001, pp. 52)

3.2.2 Contribuţia aferentelor talamocorticale la regionalizarea cortexului cerebral

Care este rolul proiecţiilor talamocorticale în formarea hărţilor senzoriale ale izocortexului? înainte de a expune o serie de cercetări, fascinante prin ingeniozitatea experimentală, să tratăm puţin formarea şi importanţa funcţională a sistemului talamocortical. Un sistem senzorial este un termen ce desemnează acele clase de neuroni care receptează, transmit şi prelucrează informaţii despre unul sau mai multe tipuri de stimuli. Fiecare sistem senzorial este compus dintr-o componentă receptoare periferică şi se proiectează într-o zonă a cortexului cerebral, putând fi conceptualizat ca o colecţie de populaţii (reţele) neuronale conectate de la periferie spre centru; fiecare astfel de reţea menţine aceeaşi organizare toplogică ce reflectă densitatea spaţială a populaţiei de receptori, acest principiu numindu-se retinotopie pentru modalitatea vizuală, tonotopie pentru cea acustică, somatotopie pentru cea somestezică. Cu excepţia sistemului olfactiv, toate sistemele senzoriale proiectează în talamusul dorsai care proiectează mai departe în ariile senzitive ale izocortexului. Din acest motiv, talamusul este considerat poarta aferentelor către cortexul cerebral (Mountcastle & Poggio, 1974).

Şi neuronii din straturile profunde ale cortexului proiectează spre talamiis, această proiecţie având de două ori mai multe fibre decât sistemul talamocortical (vezi: Steriade, Jones & McCormick, 1990). Principalele ţinte ale proiecţiei corticotaiamice sunt neuronii talamocorticali glutamatergici (excitatori) şi neuronii reticulari GABA-ergici (inhibitori). Neuronii talamocorticali proiectează înapoi spre cortex, dar neuronii reticulari proiectează pe neuronii talamocorticali, circuit care are specificul unei bucle inhibitorii (pentru detalii, vezi: Steriade, 2001; Steriade & Timofeev, 2001)

Talamusul se formează din peretele diencefalic al celui de-al treilea ventricul, separat de hipotalamus prin sulcusul hipotalamic.

Placa talamică conţine trei populaţii de progenitori ce vor forma epitalamusul, în partea dorsală, talamusul dorsal, în partea mediană, mai elevată şi talamusul ventral, în partea ventrală. Celulele talamusului dorsal se diferenţiază cel mai târziu la nivelul plăcii talamice şi proiectează foarte specific în ariile senzoriale din izocortex (pentru detalii, vezi: Miller, Chou & Finlay, 1993). În timpul corticogenezei târzii, înainte de sosirea proiecţiilor corticotaiamice, se formează şi conexiuni cortico-corticale, calosale şi subcorticale specifice (Prăsăd & colab., 1999).

Aferentele talamocorticale sunt esenţiale pentru organizarea citoarhitecturii izocortexului. Unul din sistemele experimentale în care poate fi studiat rolul proiecţiilor talamice este aria somestezică principală din cortexul somato-senzitiv de la şobolani, ale cărui celule sunt organizate funcţional sub forma unor butoiaşe (de aceea, cortexul se mai numeşte şi cortex cu butoiaşe, *barrel cortex).* La şobolan, mustăţile faciale sunt aliniate în cinci linii de la dorsal la ventral. Fiecare astfel de

organ de simţ proiectează prin nucleul trigemen din trunchiul cerebral şi, apoi, prin nucleul talamic ventro-postero-medial într-un butoiaş separat, adică o populaţie de neuroni cu aspect nuclear, situaţi în stratul IV al cortexului somato-senzitiv. Coloanele-butoiaş formează baza morfologică pentru organizarea funcţională de tip „o mustăcioară-o coloană" a cortexului smatosenzitiv al şobolanilor (pentru detalii, vezi: Erzurumlu & Kind, 2001). Experimente în care porţiuni din stratul IV din cortexul vizual primar de la şobolan, ce conţine neuroni ce nu sunt organizaţi în butoiaşe, au fost transplantate în cortexul somato-senzitiv înainte de formarea butoiaşelor, au arătat că neuronii din grefă s-au organizat sub formă de butoiaşe. Aceasta indică faptul că organizarea modulară a cortexului somato-senzitiv nu este o trăsătură specificată genetic. Ca dovadă, dacă se efectua aceiaşi transplant, dar cortexul era deaferentat de proiecţiile talamocorticale, grefa nu mai forma butoiaşe. Deci organizarea funcţională a cortexului somato-senzitiv la şobolan depinde de inputurile sosite prin proiecţiile talamocorticale care instruiesc modelarea citoarhitecturii locale (pentru detalii, vezi: Benusková & colab., 2001).

În chip similar, cortexul vizual primar este organizat în moduli funcţionali numiţi coloane de dominanţă oculară. S-a observat că

proiecţiile de la nucleii geniculaţi laterali care poartă inputuri vizuale de la un ochi se distribuie într-o serie de benzi de un diametru de aprox. O.5 mm, ce se ramifică şi se anastomozează şi alternează cu benzi ce primesc informaţii de la celălalt ochi. Experimentele de deprivare monoculară ale lui D. Hubel şi T. Wiesel au sugerat că activitatea sinaptică declanşată odată cu sosirea aferentelor latero-geniculate la cortexul vizual primar determină această segregare pe coloane funcţionale (Hubel & Wiesel, 1977; Katz & Shatz, 1996; Shatz, 1996). Experimente mai recente sugerează însă că segregarea aferentelor talamice pe coloane de dominanţă oculară se realizează printr-un proces de sortare moleculară a axonilor şi nu este afectată de perturbarea activităţii neuronilor din retină (pentru o sinteză, vezi: Crowley & Katz, 2000), ceea ce îndreptăţeşte afirmaţia lui Hubel, cum că: „Mecanisme înnăscute înzestrează sistemul vizual cu conexiuni foarte specifice, dar experienţa vizuală timpurie este necesară pentru menţinerea lor şi dezvoltarea lor completă". (Wiesel, 1981, pp.81)

Aşa cum am notat, cortexul striat primeşte proiecţii de la nucleii geniculaţi laterali; cortexul extrastriat primeşte proiecţii de la pulvinar, un nucleu talamic din partea dorso-laterală a talamusului dorsal. Dacă proiecţiile către cortexul striat sunt reduse prin enucleare bilaterală la embrionul de maimuţă Rhessus, suprafaţa cortexului striat se reduce, iar partea de cortex care ar fi trebuit să facă parte din cortexul striat capătă fie o citoarhitectură hibridă, care nu este specifică nici cortexului striat, nici extrastriat, fie devine cortex extrastriat (Rakic, Suner & Williams, 1991; Kahn & Krubitzer, 2002). Ceea ce ne atrage atenţia este că suprafaţa totală a izocortexului nu se reduce, ceea ce ar putea indica faptul că proiecţiile talamocorticale numai modelează citoarhitectură corticală (Kingsbury & Finlay, 2001).

Am menţionat deja că, la şobolan, zonele senzoriale primare sunt delimitate în prima săptămână de viaţă de zonele de asociaţie prin expresia marcată

a receptorilor nicotinici a? Această demarcare pare să depindă de aferentele de la nucleii ventrobazali ai talamusului pentru că, dacă este extirpată această parte a talamusului la vremea când axonii talamocorticali pătrund în placa corticală, expresia receptorilor nicotinici 0C7 scade semnificativ (Broide & colab., 1995). Ariile

corticale vizuală primară şi somestezică primară sunt delimitate în perioada neonatală de ariile corticale corespunzătoare de asociaţie şi prin expresia marcată a subunităţii alfa a receptorilor gama-aminobutirică (GABAA), evidentă mai ales în straturile III şi IV; în aceleaşi straturi ale ariilor senzoriale secundare, se remarcă o expresie accentuată a subunităţii (X5 a receptorilor GABAA. După ablaţia la naştere a nucleilor geniculaţi laterali şi a nucleilor ventro-postero-medieni, care proiectează în aria vizuală primară, respectiv, în aria somestezică principală, straturile III-V ale acestor zone afişează o scădere semnificativă a expresiei subunităţii a5 şi o creştere a expresiei subunităţii al a receptorilor GABAA, marker al ariilor de asociaţie. Rolul proiecţiilor talamocorticale, în acest caz, este de a stabili expresia unor receptori care să permită organizarea sinaptică specifică ariilor senzitive primare, respectiv, secundare.

Implicarea proiecţiilor talamocorticale în organizarea sinaptâcă a ariilor funcţionale ale izocortexului este susţinută de o serie de experimente ale echipei lui D.D.M. O'Leary. Ei au transplantat grefe de ţesut fetal din cortexul senzorio-motor şi vizual în cortexul postanatal şi au observat că grefa stabileşte proiecţii corespunzătoare structurii în care este transplantată, deci, răspunde la semnalele ariei gazdă, principiu ilustrat şi de Komuro şi Rakic la celulele care migrează. Astfel, cortexul vizual transplantat în cortexul senzorio-motor proiectează spre măduva spinării în timp ce cortexul senzorio-motor transplantat în cortexul vizual proiectează în tectumul optic, dar nu şi în măduva spinării. Aceste grefe nu numai că stabilesc eferenţe corecte pentru structura în care au fost transplantate, dar primesc şi aferentele îalamocorticale tipice pentru aceasta (O'Leary & colab., 1990; Stanfield & CTL – eary, 1985; O'Leary & Stanfield, 1989; O'Leary, Schlaggar & Stanfield, 1992). În sprijinul acestor rezultate, B.L. Finlay şi colaboratori? au arătat că, prin ablaţia unilaterală, imediat după naştere, a nucleului geniculat lateral, nucleului lateral şi nucleului postero-lateral ai talamusului la hamster, sunt modificate conexiunile cortexului vizual deaferentat, astfel os. se observă mai muiie proiecţii cortico-corticale şi calosale. Mai mult, aceste proiecţii cortico-corticale nu vin din cortexul vizual, aşa cumar fi normal, ci de la cortexul temporal sau somato-senzitiv (Miller, Windrem & Finlay, 1991; Kingsbury, Miller & Finlay, 1995)".

Importanţa. crucială a proiecţiilor talamocorticale pentru

formarea hărţii funcţionale a izocortexului este pusă în evidenţă, poate cel mai direct, de experimente recente în care extirparea unei părţi mari din izocortex înainte de sosirea aferenţeâoi determină comprimarea hărţii funcţionale pe porţiunea de izocortex rămasă (Huffman & colab., 1999). Proiecţiile talamice îşi fac, deci, datoria, doar că găsesc o porţiune mai redusă de regionalizat. Se formează astfel pe această parte din izocortex arii vizuale, audizive şi somato-senzitive localizate tipic pentru un izocortex normal. Din aceste rezultate putem infera că porţiunea de

140…

Izocortex rămasă este respecificată molecular foarte rapid, adică celulele din diferite zone ale acestei porţiuni trebuie să se echipeze, de pildă, cu receptorii potriviţi şi să semnalizeze axonilor talamocorticali locaţia proiecţiei corecte.

Se pune problema: ce aspect din prezenţa proiecţiilor talamocorticale este semnificativ pentru regionalizarea izocortexului? Cu alte cuvinte, este importantă sursa proiecţiei sau activitatea sinaptică stabilită de aceasta în cortexul ţintă? Această problemă a fost investigată într-o serie de experimente care au descris metoda recablării intermodale şi au definit paradigma plasticităţii transmodale (Pallas, 2001). Ipoteza că proiecţiile talamocorticale pot fi redirecţionate şi pot funcţiona la nivelul unor ţinte corticale dintr-o alta modalitate (de ex., proiecţii talamocorticale vizuale spre cortexul auditiv) este susţinută de observaţii la pacienţii cu un membru amputat, de exemplu, la care celulele din zonele adiacente zonei somestezice deaferentate îşi trimit procese, stabilesc conexiuni şi îşi extind reprezentarea somatotopică ce le corespunde în regiunea de cortex deaferentată (vezi, de ex.: Knecht & colab., 1998).

Paradigma plasticităţii transmodale prin care aferente vizuale sunt redirecţionate către arii corticale non-vizuale a fost dezvoltată la hamsteri de G.E. Schneider şi D. Frost (Schneider, 1973; Frost & Schneider, 1979), fiind extinsă prin alte cercetări la broaşte şi maimuţe (Scalia, 1987; Sur, Garraghty & Roe, 1988).

B CI

Fig. 3.12 *Diagramă care schematizează procedura recablării inter-modale. A, proiecţii normale. B, Leziuni neon atale superficiale efectuate în coliculii superiori (CS) şi inferiori (CI) deprivează nucleii geniculaţi mediali FNGM) de inputurile tipice de la El şi deprivează*

proiecţiile retinei de ţinta reprezentată de CS. Tractul optic este astfel determinat să proiecteze intermodăl spre NGM care proiectează normal în cortexul auditiv primar (Al), dar conduce inputuri vizuale. VI, cortex vizual primar. (Modificat după Pallas, 2001)

La broaşte adulte, s-a arătat că după secţionarea şi redirecţionarea nervului optic în regenerare spre telencefal rezultă proiecţii retiniene funcţionale în lobul olfactiv. În creierul animalelor normale, tracturile vizuale se îndreaptă spre coliculii superiori din mezencefal şi spre nucleii geniculaţi laterali; în mod normal, nucleii geniculaţi mediali primesc proiecţii de la coliculii inferiori. Metoda recablării intermodale presupune lezarea neonatală a coliculilor superiori şi inferiori, uneori.

141

chiar şi a cortexului vizual primar, astfel încât nucleii geniculaţi medieni sunt deprivaţi de proiecţiile de la coliculii inferiori, proiecţiile retinotectale nu mai pot proiecta spre ţinta obişnuită, coliculii superiori şi celulele ganglionare din retină sunt încurajate să proiecteze transmodal spre nucleii geniculaţi mediali (Fig. 3.12; Sur, Garraghty & Roe, 1988; Angelucci, Clască & Sur, 1998). Aceştia ajung să proiecteze normal în cortexul auditiv primar, dar proiecţia aduce inputuri vizuale. Astfel, sunt decuplate sursa de activitate a proiecţiei retinotalamice, activitatea specifică acestei proiecţii fiind alterată fără lezarea efectivă a căii. Această paradigmă permite şi abordarea echivalenţei funcţionale a ariilor corticale: dacă sunt echivalente, atunci cortexul auditiv ar trebui să proceseze informaţia vizuală. Acest fapt a fost deja demonstrat: cortexul auditiv îşi schimbă citoarhitectonica şi devine similar cortexului vizual primar, iar neuronii locali au un câmp receptor normal (Sur & colab., 1988; Roe & colab., 1990, 1992).

Cum ajung neuronii din cortexul auditiv primar să aibă proprietăţile funcţionale ale neuronilor din cortexul vizual primar? Există două posibilităţi: cortexul auditiv ajunge să fie similar structural şi funcţional cu cel vizual primar datorită unei reorganizări a conexiunilor interne sau cele două cortexuri sunt ia origine echivalente structural şi funcţional (Sur, Pallas & Roe, 1990). Aşa cum vom vedea, această problemă ajunge să reevalueeze unele concepţii fundamentale ale neurofiziologiei. O caracteristică a fiecărei arii senzoriale sunt proiecţiile sale orizontale, reprezentate de colaterale

intracorticale ale neuronilor piramidali care leagă, în general, neuroni ce răspund la aceiaşi stimuli (pentru o sinteză, vezi: Rockland, 1998). În cortexul vizual primar, de pildă, conexiunile orizontale leagă neuroni care răspund la stimuli de aceeaşi orientare (celule simple) (vezi: Hubel & Wiesel, 1979). În cortexul auditiv primar, conexiunile orizontale leagă neuronii din cadrul unui domeniu de izofrecvenţă, adică în care toate celulele răspund la aceeaşi frecvenţă tonală în cadrul hărţii tonotopice. La animalele la care a fost efectuată recablarea inter-modală, conexiunile orizontale legau neuroni răspândiţi pe o arie extinsă de cortex, deci, nu aveau organizarea caracteristică de dungi, ci domeniul celulelor relaţionate avea aspect de rozetă (Gao & Pallas, 1999). Şi conexiunile calosale se modifică la animalele cu recablare intermodală, astfel că proiecţiile calosale nu mai leagă specific domenii de izofrecvenţă din cortexurile auditive primare bilaterale, ci leagă populaţii de celule mai restrânse, care se întind pe domenii de formă neregulată (vezi: Fig. 3.13; Pallas, Littman & Moore, 1999).

Concluzia cea mai semnificativă a acestor experimente indică un fapt radical: cortexul vizual şi auditiv pot să se reorganizeze ca urmare a modificării activităţii sinaptice prin redirecţionarea unei proiecţii talamocorticale intermodale astfel încât să îşi poată procesa informaţiile reciproc. Concluzia lui Pallas şi a colaboratorilor săi este provocatoare: „[…] cortexul senzitiv primar [în general] ar putea servi ca un facilitator de contraste, implicând circuite de inhibiţie laterală tipice" (Pallas, Littman & Moore, 1999, pp. 8755). Specializarea funcţională a celulelor din reţelele cortexului vizual primar, prin care neuroni învecinaţi ajung să răspundă la stimuli de aceeaşi orientare este mediată de proiecţii intracorticale inhibitoare GABA-ergice. Deci, inhibiţia laterală pe care Pallas şi colaboratorii o

puneau în 1999 la baza organizării cortexului senzorial ar trebui să fie afectată la animalele cu recablare intermodală: neuronii GABA-ergici sunt mai puţini şi au o morfologie atipică, neuronul netrimiţându-şi proiecţii de-a lungul unei coloane corticale, ci arborizându-şi proiecţii pe orizontală (Sur & Leamey, 2001). În general, organizarea funcţională modulară a cortexului senzitiv, fie că ea presupune moduli care procesează stimuli de aceeaşi orientare sau/şi care se mişcă în aceeaşi direcţie, ca în cazul cortexului vizual

primar, fie că înseamnă organizarea unor axe*!* izofrecventă ia nivelul cortexului auditiv, pare să susţină concluzia citată mai sus (vezi şi: Kahn & Krubitzer, 2002).

Fig. **3.13** *Conexiunile calosale în cortexul auditiv primar de la maimuţe (Mustela putorius furo): animal normal (a), animal cu recablare intermodală cu leziuni extinse (B), animal cu recablare intermodală cu leziuni mai mici (C) şi animal la care a fost produsă timpuriu surditatea prin ablaţie cohleară. În A, se observă că conexiunile calosale leagă celule organizate în benzi de izofrecventă (indicate cu asterisc); chiar şi la animalele la care a fost produsă surditate, se pot observa primordii ale benzilor de izofrecventă (D). În B şi C, acestea nu se mai observă, ceea ce indică implicarea reorganizării conexiunilor calosale în modelarea citoarhitecturii din cortexul auditiv primar (vezi: text).* (Adaptat după Pallas, Littman & Moore, 1999, cu permisiunea autorilor)

3.3 Neurogeneza în creierul adult. Precursorii neuronali şi terapia celulară

Dacă am face o prezentare cuminte a dezvoltării cortexului, acest capitol ar trebui să se termine aici. În acest caz, concluzia ar fi că sistemul nervos central al mamiferelor devine structural stabil la puţin timp după naştere şi rămâne aşa pe tot parcursul vieţii. Un corolar al acestei concepţii este că, în creierul adult, nu sunt

adăugaţi noi neuroni. După ce am văzut creierul „în mişcare", este greu să credem că, odată cu naşterea, dezvoltarea sa se opreşte. În acest context, cum putem împăca flexibilitatea comportamentului, care aşa cum ne-am convins, este solicitată de mediul nonstaţionar cu „tăcerea" în care ar funcţiona creierul. Dacă mediul este dinamic şi comportamentul este flexibil, am putea putea crede că, în acest triplet, creierul este cel mai puţin „deştept". În fond, majoritatea teoriilor comportamentului, ne referim aici la cele care iau în considerare relaţia dintre creier şi comportament, se bazează pe presupunerea că creierul adult este format din reţele stabile în ceea ce priveşte numărul de neuroni (Kempermann, 2002; Gross, 2000). Sigur, se acceptă că în aceste reţele intervin modelări ale proceselor neuronale şi ale sinapselor. Celulele îşi extind dendrite şi fac noi sinapse, acest tip de remodelare părând să salveze creierul de la o tăcere absolută. Un fapt demonstrat demult, dar acceptat de curând, este că creierul continuă

să se „mişte” şi după formarea citoarhitecturilor şi specificarea funcţională a acestora. Cea mai provocatoare demonstraţie în acest sens este că, în creierul adult, se produc, e adevărat în zone limitate, noi celule. Aceasta ne poate indica faptul că, la naştere, creierul este un mecanism pregătit din punct de vedere structural şi funcţional pentru a susţine comportamentul. Dar comportamentul evoluează. Neuroştiinţele au arătat că şi creierul evoluează într-un ritm compatibil cu flexibilitatea comportamentului. Cu alte cuvinte, morfogeneza sistemului nervos central, care circumscrie viaţa embrionară de după inducţia neurală şi până la scurt timp după naştere, este ca o şcoală în care creierul se pregăteşte pentru profesiunea sa, comportamentul. Dar ştim cu toţii că nicio şcoală nu reuşeşte să creeze experţi. După ce a absolvit morfogeneza, creierul se angajează în adaptarea la mediul nonstaţionar. Dar eficienţa sa depinde nu de specializare pentru că nu se confruntă cu un set limitat de situaţii în care să aplice câteva soluţii de succes. Eficienţa sa depinde de adaptare (plasticitate), astfel încât să poată susţine inovaţia comportamentală. Un astfel de mecanism de adaptare este capacitatea creierului de a produce noi celule după încheierea morfogenezei şi în timpul vieţii adulte. Vom explora în continuarea acest fenomen, acceptând că dezvoltarea creierului înseamnă nu specializare, ci adaptare.

După formarea tubului neural, celulele neuroepitelia Fe care au proliferat rapid încă din etapa şanţului neural, vor da naştere mai întâi neuroblaştilor şi, apoi, glioblaştilor din care se va forma efectiv tot sistemul nervos central matur (Langman, 1968). După ce celulele neuroepiteliale încetează să mai producă neuroblaşti şi glioblaşti, acestea se diferenţiază în celule ependimare (Takahashi, Nowakowski & Caviness, 1996). Luându-se în considerare că stratul neuroepitelial se atrofiază la câteva zile după naştere, s-a considerat mult timp că sistemul nervos central adult nu conţine celule care să se poată reînnoi şi ai căror progenitori să se poată diferenţia în mai multe tipuri de celule (vezi: Altman, 1962). Această capacitate a unor celule de a se autoreânnoi şi de a genera mai multe tipuri de celule se numeşte pluripotenţialitate (Gritti, Vescovi & Galii, 2002). În alte sisteme însă, cu o rată de reînnoire (turnover) mare, cum ar fi epiderma sau sistemul hematopoietic din organismul adult, au fost izolaţi astfel de precursori care pot

asigura înlocuirea celulelor diferenţiate, cu un ciclu de viaţă scurt (pentru detalii, vezi: Olteanu, 1980). Aceşti precursori pluripotenţi au fost numiţi celule suşe sau celule stern (fr. *suche,* buturugă).

Presupunerea existenţei celulelor suşe în creierul adult a fost susţinută pentru prima dată de studii care semnalau prezenţa unei activităţi mitotice în zona subependimară a ventriculilor laterali (Allen, 1912; Kershnam, 1938; Smart, 1961) şi că noi neuroni se formează postnatal în cortexul cerebelar al şoarecilor (Sidman & Miale, 1959; Miale & Sidman, 1961). La acel moment, au existat unele argumente care considerau că celulele suşe din creierul adult ar fi vestigii filogenetice de la: organisme mai puţin evoluate, ca planariile sau peştii, la care autoreânnoirea tisulară permite supravieţuirea în medii neospitaliere sau corespunde unor comportamente sezoniere (Rakic, 1985 b; Rakic & Kornack, 1993).

În acea perioadă, este introdusă metoda autoradiografiei cu ^{3}H-timidină. Sintetic, metoda are la bază un principiu simplu: timidina marcată cu un izotop radioactiv, de obicei, tritiu, este încorporată de ADN-ul nuclear în timpul fazei S a ciclului celular, când se sintetizează ADN. Izotopul radiaoctiv are rol de marker sau trasor pentru că permite localizarea celulelor care au încorporat timidina prin plasarea secţiunii pe o emulsie fotografică pe care radiaţiile emise de trasor lasă pete opace cu diametru de – 1 um. Astfel se poate stabili data naşterii unei celule prin numărul de granule de argint situate imediat deasupra sa, pe emulsia fotografică. Se consideră că o celulă este nou produsă dacă granulele de argint localizate în zona nucleului său reprezintă cel puţin 50% faţă de numărul granulelor corespunzătoare nucleilor cel mai intens marcaţi de pe secţiune (pentru detalii, vezi: Nowakowski & Rakic, 1974). În 1989, R.S. Nowakowski şi colaboratorii descriu un derivat al timidinei, bromodeoxiuridină, care poate fi şi el încorporat de ADN-ul celulelor în faza S (Nowakowski, Lewin & Miller, 1989).

Prin metoda timidinei tritiate s-a arătat că neuronii reprezintă un tip de epiteliu care nu se reînnoieşte şi, deci, nu se poate regenera (Leblond, 1964). J. Altman şi G. Das au demonstrat cu ajutorul aceleiaşi metode continuarea genezei gliale şi neuronale în girusul dinţat din hipocamp, în bulbul olfactiv şi în cortexul cerebral al şobolanilor adulţi, deschizând seria unor cercetări asemănătoare la alte specii

(Altman, 1963, 1969; Altman & Das, 1965 a, b; Korr, 1980; Bayer, Yackel & Puri, 1982; Cameron & colab., 1993; Gould & colab., 1999 a). Cercetări ultrastructurale efectuate mai ales de M.S. Kaplan au confirmat că aceste celule nou produse sunt, de fapt, neuroni (Kaplan & Hinds, 1977; Kaplan, 1981, 1985; Kaplan & Bell, 1984). Cu toate acestea, demonstrarea neurogenezei adulte a fost primită cu scepticism. Deşi rolul funcţional al producerii de noi neuroni părea să fie I din ce în ce mai bine definit la păsări, de pildă, unde o astfel de zonă priâiferativă este aşa-numitul „centru al cântecului", relevanţa acestor studii nu a fost larg recunoscută în acea perioadă. Reticenţa poate fi explicată prin opoziţia a doua fapte demonstrate experimental: pe de o parte, neuronii nu se pot divide, iar, pe de altă parte, neuroni noi sunt produşi şi după încheierea morfogenezei sistemului nervos central. De fapt, cele două seturi de date sunt corecte şi pot fi conciliate, dar acest lucru a fost realizat şi demonstrat relativ recent. Posibilitatea de conciliere porneşte

de la presupunerea persistenţei unei populaţii de precursori care continuă să se dividă şi după producerea valurilor de neurogeneză din perioada embrionară, care construiesc cea mai mare parte din citoarhitectura cortexului cerebral. Într-adevăr, s-a arătat că în creierul adult există o populaţie de celule mitotic active, care au proprietăţile celulelor suşe: se pot reînnoi şi pot genera mai multe tipuri de celule, cum ar fi neuroni, astrocite şi oligodendrocite.

Celulele suşe au putut fi identificate în zona subventriculară dorso-laterală a ventriculilor laterali din creierul adult, dar şi în zona ventriculară a canalului central al măduvei spinării. Să nu uităm că zona subventriculară formează o matrice proliferativă secundară în timpul corticogenezei şi că se considera că, la scurt timp după naştere, celulele din această zonă şi din zona ventriculară îşi stopează activitatea proliferativă şi devin celule ependimale. Deşi ambele populaţii de celule, atât cele din zona ventriculară, cât şi cele din zona subventriculară, sunt mitotic active în perioada adultă, ele diferă prin soarta progenitorilor şi contribuţia la regenerarea sistemului nervos central.

Se consideră, astfel, că în zona ventriculară, celulele neuroepiteliale produc neuroblaştii şi glioblaştii şi, într-adevăr, se diferenţiază la câteva zile postnatal în celule epiteliale cuboidale

stabilizate în zona ependimară a ventriculilor laterali. Însă înainte de a se diferenţia în celule ependimale, celulele neuroepiteliale formează matrice germinative secundare şi terţiare localizate în zona subventriculară (Altman, 1982; Altman & Bayer, 1990 a, b; Reznikov, Acklin & van der Kooy, 1997). Zona subventriculară conţine o populaţie eterogenă de celule diferenţiate şi nediferenţiate care pot să genereze neuroni şi celule gliale pe tot parcursul vieţii (Morshead & van der Kooy, 1992; Wichterle, García-Verdugo & Alvarez-Buylla, 1997; Kuhn, Dickinson-Anson & Gage, 1996). Deci neurogeneză precede gliogeneza în timpul morfogenezei (Hirano & Goldman, 1988), dar se poate sincroniza cu aceasta în funcţie de semnalele modulatoare din micromediul celular, pe tot parcursul vieţii (Kalyani & colab., 1998). Proprietăţile acestor celule suşe izolate din zona subventriculară au fost analizate sistematic.

3.3.1 Celulele suşe

Celulele suşe neuronale**1** sunt celule izolate din sistemul nervos central, care au proprietăţile de a fi clonogenice, putându-se reînnoi pe o perioadă îndelungată sau nelimitată, şi pluripotente, ai căror progenitori se pot diferenţia pe mai mult de o linie celulară (Davis & Temple, 1994; Watt & Hogan, 2000). Se consideră că zigotul este tutipotent (lat. *totuşi,* integral) pentru că din el pot fi derivate toate celulele unui organism, inclusiv cele din sistemul nervos central şi periferic, dar şi celulele care constituie organele de comunicare materno-fetale, cum ar fi placenta. Celulele suşe neuronale sunt doar pluripotente (lat. *plures,* mai

Vom folosi denumirea de celule suşe neuronale pentru a desemna precursorii din sistemul nervos central adult, având în vedere însă că aceste celule sunt pluripotente şi pot genera şi alte tipuri de celule decât neuroni.

multe) pentru că pot genera decât celulele care vor popula organismul embrionului, nu şi trofoblaştii din care s-ar diferenţia placenta (McKay, 2000; Gage, 2000).

Sistemele precursor sunt formate din trei tipuri de celule: celule suşe, celule intermediare şi celule diferenţiate (Loeffler & Potten, 1997). Această clasă a celulelor intermediare este reprezentată de celule pe un continuum de diferenţiere, cuprinzând atât progenitori pluripotenţi, dar cu o capacitate proliferativă mai redusă, cât şi

progenitori restricţionaţi să se diferenţieze numai pe o linie celulară (de pildă, progenitori restricţionaţi neuronali sau gliali; Mayer-Proschel & colab., 1997; Rab & Mayer-Proschel, 1997). Progenitorii pluripotenţi au o capacitate proliferativă mai redusă decât precursorii lor, rolul lor fiind, probabil, acela de a mări populaţia de celule diferenţiate ce provin din diviziunea unei celule suşe. Este posibil, deci, ca celulele suşe să se dividă cu o frecvenţă relativ mică, mărirea efectivului de celule ce se vor diferenţia fiind lăsată în seama diviziunii progenitorilor pluripotenţi. Fiind diferenţiaţi într-o fază mai avansată, progenitorii restricţionaţi mai pot fi izolaţi numai din anumite zone din creierul adult, spre care migrează (Luskin, 1993). Există posibilitatea ca limitarea potenţialului de diferenţiere a progenitorilor să apară de timpuriu în cursul dezvoltării lor, ştiindu-se că, de exemplu, doar progenitorii neuronali izolaţi din hipocamp, dar nu şi cei izolaţi din cerebel sau mezencefal, pot genera neuroni piramidali hipocampici. Cu toate acestea, progenitorii restricţionaţi neuronali sunt încă plastici, cel puţin în privinţa stabilirii unui fenotip neuronal (Yang & colab., 2000).

Diviziunea celulelor suşe este descrisă ca simetrică, în care o celulă suşă produce doi progenitori pluripotenţi ce vor reface efectivul celulelor suşe sau asimetrică, în care una din cele două celule-fiice se diferenţiază pe o iinie celulară, iar cealaltă înlocuieşte celula-mamă în populaţia de precursori. Există două mecanisme prin care celulele suşe pot genera progenitori ce se vor diferenţia. Printr-un mecanism invariant, o celulă suşă dă naştere prin diviziune asimetrică la un precursor identic şi la o celulă fiică ce se va diferenţia. La cealaltă extremă, este un mecanism reglator prin care o celulă suşă generează celule-fiice care au o probabilitate determinată de a fi celule suşe sau progenitori restricţionaţi (Hall & Watt, 1989). Mecanismul invariant pare să fie definitoriu pentru diviziunea celulelor neuroepiteliale în timpul morfogenezei embrionare. Mecanismul reglator, în care probabilitatea celulelor-fiice de a se diferenţia este variabilă şi este determinată de mai mulţi factori, ar putea fi caracteristică diviziunii celulelor suşe neuronale din zona subventriculară.

Celulele suşe neuronale pot fi izolate din sistemul nervos central încă din ziua embrionară E 12 şi pe tot parcursul vieţii adulte (Davis & Temple, 1994; Johe & colab., 1996). Metodele standard de izolare a celulelor suşe neuronale constau din explantarea unui regiuni din

creierul fetai sau adult care se ştie că ar conţine precursori mitogenic activi *în viyo,* cum ar fi zona subventriculară sau girusul dinţat hipocampic. Ţesutul este disociat, iar celulele sunt expuse la concentraţii

mari de factori mitogeni, cum ar fi anumiţi factori de creştere, în medii de suspensie sau pe straturi trofice de fibroblaşti (pentru detalii, vezi: Odorico, Kaufman & Thomson, 2001). După un număr limitat de diviziuni, în funcţie de

mitogenul care este prezent în mediu, celulele vor forma aşa-numite neurosfere, adică agregate tridimensionale de celule în diferite grade de diferenţiere (Reynolds & Weiss, 1992). Pentru a determina dacă neurosferele conţin precursori ce se pot reînnoi, se stabilesc culturi secundare de lungă durată în care celule disociate din neurosfere sunt expuse din nou la factori mitogenici (pentru detalii despre metode de disociere, vezi: Caseta 3. A). Aceasta este metoda indirectă prin care sunt identificate celulele suşe neuronale *in vitro,* după cele trei criterii fundamentale: populaţii de celule care se reînnoiesc, se extind şi sunt pluripotente (Reynolds & Weiss, 1996; Weiss & colab., 1996). În continuare, vom discuta cercetările care au arătat că aceste celule se reînnoiesc, formează la rândul lor neurosfere şi pot genera atât neuroni, cât şi celule gliale (Richards, Kilpatrick & Bartlett, 1992; Lois & Alvarez-Buylla, 1993).

S-a demonstrat recent că celulele suşe neuronale din sistemul nervos central ar putea fi izolate şi direct, prin selecţia pozitivă şi negativă cu ajutorul unor anticorpi pentru anumiţi antigeni (Uchida & colab., 2000). Adică, dacă aceste celule au antigeni membranari, pentru care poate fi construit un anticorp selectiv (monoclonal) care să îi recunoască, celulele suşe ar putea fi identificate direct. O mare parte din celulele izolate din creierul fetal care prezintă antigenul CD133, recunoscut de anticorpul 5F3, sunt clonogenice şi pluripotente, putând produce *in vitro* neuroni şi celule gliale. Aceste populaţii celulare sunt, totuşi, eterogene. Subpopulaţiile de celule CD133 + care exprimă şi niveluri negative sau scăzute de antigen CD_24 (CD133 **+** /CD_24 **scâzul/**), recunoscut de anticorpul 8G1, conţin cele mai multe celule iniţiatoare de neurosfere. Aceste subpopulaţii ar putea reprezenta sisteme precursor de lungă durată, faţă de CD1337CD_24 **mare** care ar fi progenitori pluripotenţi de scurtă durată, dihotomie ce apropie

celulele suşe din sistemul nervos central de precursorii din alte sisteme, cum ar fi sistemul hematopoietic (vezi clasificarea de mai sus, a lui Loeffler & Potten, 1997). Această metodă directă de izolare a celulelor suşe neuronale de progenitori trebuie însă în continuare validată.

Celulele suşe neuronale sunt prezente, aşa cum am menţionat, în zona subventriculară a ventriculilor laterali şi în jurul canalului ependimar al măduvei spinării (Adrian & Walker, 1962). Există dovezi că celulele suşe neuronale sunt prezente de-a lungul întregului neuroax ventricular (de pildă, şi în vecinătatea ventriculilor III şi IV), nu numai în zonele adiacente ventriculilor laterali, sugerând un rol neurotrofic general al ţesutului ependimar în proliferarea şi diferenţierea precursorilor pluripotenţi (Chauhan & Lewis, 1979). Cu toate acestea, populaţia de celule suşe din zona subventriculară a ventriculilor laterali este cea mai activă mitotic. Iniţial, cercetările au arătat că o parte din aceste celule au activitate mitotică, majoritatea progenitorilor suferind însă apoptoză (Morshead & van der Kooy, 1992). Există însă numeroase studii mai recente care demonstrează viabilitatea progenitorilor neuronali şi gliali derivaţi din aceşti precursori care, de pildă, pot migra pe distanţe lungi pentru a înlocui neuroni granulari şi periglomerulari din bulbul olfactiv (vezi, de pildă: Lois & Alvarez-Buylla, 1994).

148

Caseta 3.A

METODE DE IZOLARE, PROLIFERARE ŞI DIFERENŢIERE *IN VITRO A*

CELULELOR SUŞE NEURONALE

Prima etapă pentru izolarea celulelor suşe neuronale este prelevarea de ţesut din diverse zone ale creierului sau ale măduvei spinării. Probele de ţesut sunt plasate mai întâi în lichid cefalo-rahidian artificial pentru a putea fi secţionate selectiv. Celulele ce compun ţesutul sunt disociate fie mecanic, cu ajutorul unei pipete Pasteur ascuţită prin încălzire, fie enzimatic, în medii din care lipsesc Ca^{2+} şi Mg^{2+} sau în prezenţa tripskiei. Aceste celule sunt centrifugate şi sunt plasate în medii nonadezive ce conţin ser alături de alte substanţe (de ex., glucoza, bicarbonat de sodiu, glutamină) sau un preparat substitutiv din hormoni şi săruri (de ex., insulina, transferină, progesteron, putrescină, selenit de sodiu) la care se

adaugă factorii mitogeni (de ex., factori

I de creştere cum ar fi FGF, EGF, LIF). Celulele pot fi plasate pe Un strat unic

[de fibroblaşti care au fost inactivaţi mitotic prin iradiere. S-a stabilit că

I prezenţa factorilor de creştere, a unor factori autocrini/paracrini furnizaţi de fibroblaşti şi a mediilor nonadezive este necesară pentru iniţierea diviziunii celulelor suşe neuronale (pentru o sinteză, vezi: Odorico, Kaufman &

[Thomson, 2001).

După 7 – 8 zile *in vitro,* în cultură se observă agregate tridimensionale de celule nediferenţiate numite neurosfere primare (Reynolds & Weiss, 1992). Celulele neurosferelor primare pot fi disociate din nou pentru a testa dacă precursorii sunt clonogenici şi pot da naştere la neurosfere secundare. Celulele disociate pot fi plasate împreună sau separat într-un mediu mitogenic similar celui iniţial. Se poate testa ordinea şi importanţa acţiunii diferiţilor factori de creştere sau a unor combinaţii ale acestora dacă celulele disociate din neurosferele primare sunt plasate în medii cu alţi factori mitogenici (paradigma schimbării factorului mitogenic). De pildă, celule dintr-o cultură extinsă în FGF pot fi plasate în medii conţinând numai EGF. Pentru a induce diferenţierea, precursorii neuronali sunt transferaţi în vase de cultură tratate cu gelatină, în prezenţa factorilor de creştere, dar fără stratul trofic. Fenotipul celular este determinat prin metode imunocitochimice.

Referinţe bibliografice:

Odorico, J.S., Kaufman, D.S., Thomson, J.A. (2001). *Multilineage differentiation from kiinian embryonic stern cell lines.* Stern Cel Îs, 19, 193 – 204 Ray, J., Peterson, D.A.; Zbhiristine, M, Gage, F.H. (1993). *Proliferatibn, differentiation, and long-term cititure of primaiy hippocampal neurons.* Porc. 'Natl. Acad. Sci. USA, 90, 3602 – 3606 Reynolds, BA., Weiss, S. (1992). *Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous sistem.* Science, 255, 1707 – 1710

149

Unele cercetări susţin că doar zona subventriculară, nu şi cea ventriculară, ar conţine celule clonogenice multipotente. Ce se ştie despre celulele ependimale din zona ventriculară? Celulele ciliate

ependimale prezintă receptori pentru factorul de creştere fibroblastic (FGF2) şi pentru factorul de creştere epidermal (EGF) şi pot prolifera după anumite leziuni cerebrale (Matsuo & colab., 1995; Sarnat, 1995). Celulele ependimale formează sfere primare chiar în culturi din care lipsesc factorii de creştere, dar celulele disociate din aceste sfere nu mai sunt clonogenice. Aceste sfere primare generează exclusiv progenitori gliali ce contribuie, probabil, la crearea ţesutului cicatricial în cazul unei leziuni. Deci celulele ependimale pot suferi un tip de diviziune reactivă, dar nu se pot diferenţia decât în astrocite care vor forma ţesutul cicatricial din zona leziunii. Spre deosebire de celulele ependimale, progenitorii celulelor din neurosferele derivate din celule din zona subventriculară sunt clonogenici şi multipotenţi, putându-se reînnoi şi putând produce atât neuroni, cât şi astrocite şi oligodendrocite (Chiasson & colab., 1999). Pornind de la aceste date, se consideră că doar celulele din zona subependimală sunt multipotente, existând, aşa cum vom vedea, controverse în privinţa identităţii unor celule suşe neuronale propriu-zise în această zonă care, după unele studii, ar putea fi progenitori astrocitari pluripotenţi.

Zona subventriculară conţine o populaţie eterogenă de precursori şi progenitori în faze de diferenţiere mai mult sau mai puţin avansate, astfel că celulele suşe (o% din totalul local de celule; Tropepe & colab., 1999) nu pot fi detectate cu tehnici de etichetare obişnuită. Comportamentul mitotic al acestor celule a putut fi stabilit prin injectarea unor doze mari de ^{3}H-timidină pentru a distruge celulele aflate în proliferare, pentru ca apoi celule disociate din explanturi din zona subventriculară, între care s-ar găsi şi celule suşe, să fie testate pentru potenţialul de a forma neurosfere. Analiza ciclului celular al acestor celule arată că există cel puţin două categorii de celule suşe neuronale. Astfel, există un grup de precursori proliferativ activi, cu un ciclu celular scurt, de numai 12, 7 ore, şi un grup de precursori relativ pasivi, cu un ciclu celular mai lung de 15 zile (Morshead, Craig & van der Kooy, 1998). S-a stabilit că precursorii proliferativ activi sunt progenitorii precursorilor relativ pasivi, astfel că se poate considera că aceştia din urmă reprezintă, de fapt, populaţia de celule suşe neuronale endogene (Morshead & colab., 1994).

S-a mai arătat că aceste celule din zona subventriculară diferă şi prin receptorii pentru diferiţii factori de creştere. Celule suşe neuronale responsive la FGF2 pot fi izolate încă din ziua embrionară E

8, 5, în număr din ce în ce mai mare pe măsura dezvoltării embrionare a creierului (Tropepe & colab., 1999). Între E 11 şi E 14, între aceste celule FGF2-responsive, apar şi celule suşe neuronale care proliferează în prezenţa EGF. S-a tras concluzia că, în creierul embrionar, există la început doar celule FGF-responsive care proliferează prin diviziune simetrică. Între E 11 şi E 14, aceste celule intră în diviziune asimetrică şi apar astfel celulele EGF-responsive (Martens, Tropepe & van der Kooy, 2000). Când intră în diviziune asimetrică, ciclul celuleor FGF-responsive creşte de la – 17, 6 ore (E 11) la – 26, 5 ore (E 14). Aceste celule fac parte din grupul celulelor suşe neuronale proliferativ

active. Aproximativ 10% din celulele FGF-responsive au un ciclu celular mai lung, putând fi vorba de precursorii relativ pasivi. Creşterea ciclului celular ar putea să aibă loc prin creşterea duratei fazei Gi, celula suşă dispunând astfel de o perioadă mai lungă pentru a răspunde la modificări ale micromediului celular (vezi: discuţia de mai sus, despre neurogeneza embrionară).

Pentru studiul diferenţierii celulelor suşe şi eventuale aplicaţii clinice este necesară stabilirea unor culturi de lungă durată de precursori neuronali în prezenţa unor factori mitogenici, cum ar fi factorii de creştere. Factorul de creştere neuronal (NGF), de pildă, asigură supravieţuirea neuronilor colinergici *in vitro,* izolaţi din sept, striatum sau nucleii bazali (Levi-Montalcini & Angeletti, 1965; Cattaneo & McKay, 1990). Influenţa FGF este direct proporţională cu doza prezentă în cultură, celulele supravieţuind la doze mici, dar putând prolifera nelimitat numai ia doze >10 nu/ml. De asemenea, contactul celular pare să fie important, diviziunea celulelor având loc mai ales în interiorul agregatelor celulare stabilite în aprox. 14 zile în prezenţa FGF. Factorul de creştere epidermal este un mitogen puternic asupra unor tipuri diverse de celule, inclusiv precursori neuronali, facilitând, de asemenea, regenerarea tisulară în epidermă, ficat sau epiteliu intestinal (Reynolds & Weiss, 1992). Atât FGF, cât şi EGF au un rol important în dezvoltarea sistemului nervos central, dar influenţează şi procesele celulare proliferative în creierul adult. Studii recente arată că celulele multipotente prezintă receptori pentru majoritatea factorilor de creştere cunoscuţi şi că aceşti factori ar putea induce programe celulare specifice (Schuldiner & colab., 2000). Speculăm, deci, că, după încheierea morfogenezei sistemului nervos

central, comportamentul mitotic al celulelor din zona subventriculară devine variabil, prin mecanismul reglator postulat mai sus, în funcţie de concentraţia locală a unui cocktail de factori de creştere cum ar fi FGF2, EGF, NGF ş.a.

Dar care este influenţa sistematică a principalilor factori de creştere investigaţi, FGF şi EGF, asupra celulelor suşe neuronale? Ei acţionează asupra celulelor suşe din zona subventriculară care prezintă atât receptorul de tip 1 pentru FGF, cât şi receptorul pentru EGF. Mai mult, celule suşe menţinute în culturi cu FGF îşi menţin receptivitatea şi la EGF şi invers (Gritti & colab., 1995). Retragerea factorilor de creştere din cultură opreşte proliferarea şi declanşează diferenţierea precursorilor în neuroni, astrocite şi oligodendrocite (Gritti & colab., 1996). FGF pare să determine proliferarea mai lentă a precursorilor subventriculari, faţă de EGF ce ar induce o proliferare mult mai rapidă. Combinaţia celor doi

I factori de creştere are un efect aditiv asupra proliferării precursorilor (Gritti & colab., 1999).

Celulele suşe neuronale sunt prezente şi în măduva spinării. Studii iniţiale

I indicau că o populaţie redusă de precursori neuronali s-ar putea găsi în zona

I ependimală a măduvei spinării (8% celule etichetate cu 3H-timidină), faţă de ventriculii laterali în care zona subventriculară conţine o populaţie mai numeroasă

I de celule suşe neuronale (22% celule JH + – timidină; Kraus-Rupert & colab., 1975).

Celule suşe neuronale au putut fi identificate în regiunea toracală, respectiv, lombaia/sacrată a măduvei spinării (Weiss et al., 1996). Spre deosebire de celulele

suşe neuronale izolate din zona subependimală care pot prolifera *in vitro* în prezenţa unui singur factor mitogen, fie FGF, fie EGF, aceşti precursori din măduvă proliferează numai în prezenţa simultană a celor doi factori de creştere. Celulele suşe neuronale din zona subventriculară intră în diviziune după – 2 zile în medii de suspensie cu EGF şi ating un platou de proliferare după – 7 zile. Chiar după 8 – 10 zile în cultură, precursorii neuronali spinali nu produc sfere primare în prezenţa doar a EGF sau generează doar oligosfere

primare, fără a putea genera şi sfere secundare în prezenţa FGF. O ipoteză posibilă este că diviziunea precursorilor neuronali spinali din zona toracală necesită prezenţa heparinei. Astfel de precursori pot genera sfere primare după 8 zile în prezenţa FGF + heparină, celule izolate din aceste sfere răspunzând apoi la EGF şi putând genera sfere secundare. Aceste celule suşe spinale pot răspunde la leziuni locale contribuind la formarea cicatricii gliale (Frisen & colab., 1995).

După adăugarea în cultură a unui morfogen care induce diferenţierea precursorilor, cum ar fi acidul retinoic, aceştia ies din ciclul mitotic, corpul celular se hipertrofiază şi încep să îşi extindă procese. Aceşti precursori generează progenitori restricţionaţi neuronali, care pot sintetiza şi răspunde la numeroşi neurotransmiţători, inclusiv dopamină, un neurotransmiţător care nu este prezent *în vivn* la nivel spinal, dar şi acid y-aminobutiric (GABA), glutamat, glicină, acetilcolină sau combinaţii ale acestora. Se pare că precursorii spinali nu au constrângeri fenotipice, astfel că pot genera şi alte celule decât neuroni spinali (de pildă, celule sintetizatoare de dopamină). În schimb, aceşti precursori prezintă caracteristici specifice sistemului nervos adult. Celulele prelevate din măduva embrionară se depolarizează în prezenţa glicinei sau GABĂ, neurotransmiţători inhibitori în sistemul nervos central adult, răspunsul lor inversându-se pe măsura maturării *in vitro* (Cherubini, Gaiarsa & Ben-Ari, 1991). Celulele suşe neuronale din măduva adultă prezintă receptori pentru GABA şi glicină, dar nu se depolarizează ca răspuns la aceşti neurotransmiţători, deci, sunt celule cu un fenotip „matur". (Kalyani & colab., 1998). – ...

S-a considerat până.de curând că potenţialul de diferenţiere, al celulelor suşe este limitat la ţesutul de origine. Astfel, celule şuşe derivate din ţesutul A (ţesut nervos) ar. putea genera numai celule diferenţiate specifice ţesutului A (neuroni, astrocite, oligodendrocite), fără a se putea diferenţia pe linii celulare specifice ţesutului B sau C (de ex., cardiomiocite, progenitori hematopoietiei, adipocite). Un corolar al acestei teze este că diferenţierea. progenit Orilor este condiţionată genetic, deci, că celulele suşe din diverse sisteme prezintă genomuri diferite (Chu & Gage, 2001). Alternativa teoretică propune un genom universal pentru precursori, diferenţierea depinzând de semnalizarea extracelulară.

Analizele genomice, nu pot fi efectuate direct pentru că, în

prezent, este foarte dificilă şi nesigură separarea fizică a celulelor suşe de progenitorii restricţionaţi. Grupul condas de D. Geschwind a folosit, totuşi, o procedură de hibridizare ingenioasă pentru astfel de analize. Din ţesut cortical prelevat de la şoareci imediat după naştere (P O), celulele întreţinute mitotic în prezenţa FGF pentru – 2 săptămâni, au fost împărţite în două grupuri: progenitori neuronali care

au fost menţinuţi în FGF şi celule diferenţiate la care FGF a fost retras din cultură pentru 24 de ore. Secvenţa specifică transcrisă în celulele diferenţiate a fost scăzută din secvenţa transcrisă în progenitorii neuronali, obţinându-se astfel o descriere genomică relativ specifică pentru celulele suşe neuronale (Geschwind & colab., 2001). Folosind această descriere genomică a celulelor suşe pluripotente, s-a arătat de curând că există un set de gene comun pentru celulele hematopoietice şi pentru celulele din neurosfere, dar nu şi în celulele diferenţiate. Mai mult, s-a demonstrat că aceste gene sunt exprimate preferenţial în zona ventriculară de la E 13 până în perioada adultă. O confirmare suplimentară a validităţii acestui set de gene specific cel puţin precursorilor hematopoietici şi neuronali constă în faptul că şoareci la care s-a efectuat deleţia uneia din aceste gene comune posibil implicată în supravieţuirea şi migrarea progenitorilor neuronali, *Ku-W,* prezintă atât limfogeneză, cât şi neurogeneză deficitare (Cu & colab., 2000).

Specificitatea acestor gene trebuie confirmată însă şi prin demonstrarea multipotenţialităţii celulelor rezultate prin cohibridizare (Chu & Gage, 2001). Oricum, judecând după aceste cercetări, diferenţierea celulelor suşe ar depinde, deci, de factori epigenetici locali. Factorii neurotrofici par să favorizeze supravieţuirea celulelor, în timp ce contactul celular creşte cu până la 60% eficienţa derivării unor progenitori neuronali (vezi: Lim & Alvarez-Buylla, 1999). S-a arătat astfel că celulele suşe neuronale izolate din creierul adult pot repopula sistemul hematopoietic, dând naştere la celule mieloide şi limfoide, dar şi unor celule mai primitive (Björnsson & colab., 1999). Aceste experimente au generat o discuţie care pare să prindă proporţii: este diferenţierea o stare celulară ireversibilă?

Ce înseamnă, în primul rând, diferenţierea unui neuron? După ce neuroblastul, celulă tânără, a părăsit zone proliferativă şi a migrat într-o locaţie definită tangenţial şi radial, el începe să îşi extindă

procese, capătă morfologia specifică neuronilor din citoarhâtectura unde s-a agregat şi face sinapse. Din punct de vedere molecular, el capătă un fenotip, adică se echipează cu receptori şi cu enzimele necesare pentru a produce un anumit tip de neurotransmiţător (pentru detalii, vezi: Caseta 3. B). El contactează sinapse şi aşteaptă sinapse de la alte celule, stabileşte, deci, relaţii trofice şi funcţionale cu celulele din reţeaua din care face parte. După această descriere, cu expresia unui clasic al neurobiologiei celulare, „diferenţierea celulară este complicaţia finală"! (Nowakowski, 1996)

Există, recent, unele argumente după care această afirmaţie nu este genera) valabilă. Astfel, sunt invocate experimente ca cele în care Alvarez-Buylla sugerează că astrocitele pot genera neuroni care să repopuleze reţeaua migratorie rostrală (vezi: mai jos). Mai mult, experimente ca cele de mai sus în care s-a demonstrat că celulele suşe neuronale şi hematopietice adulte pot genera şi alte celule decât cele specifice sistemului nervos sau sângelui, cum ar fi hepatocite, celule din epiteliul intestinal, celule musculare scheletice sau miocardice. Aceste presupuneri conduc la ideea că aceste celule suşe sunt într-o condiţie celulară primară şi se pot transdiferenţia. Se sugerează că identitatea celulei este dictată de semnale din nişa în care aceasta se află. Există unele probe experimentale pentru această teză. Pe scurt, dacă celule suşe neuronale izolate din creierul adult sunt

Caseta **3.B**

NEURON SAU CELULĂ GLIALĂ? DESCRIEREA MOLECULARĂ A

DIFERENŢIERII CELULARE

Celulele neuroepiteliale dau naştere într-o perioadă iniţială la neuroni, apoi la celule gliale (excepţie fac celulele gliale radiale care sunt generate înaintea valurilor de neurogeneză). Semnalele moleculare care modulează soarta celulară au fost descrise mai ales în cazul crestelor neurale. Astfel, s-a demonstrat că molecula de semnalizare numită Notch determină diferenţierea progenitorilor în celule gliale (Morrison & colab., 2000). Genele *Hes* sunt cele care recepţionează acest semnal şi reprimă mai departe expresia unei familii de factori de transcripţie numite *BHLH (basic helix-loop-helix)*, după forma domeniului cu care se leagă de molecula de ADN (pentru o sinteză, vezi: Brunet & Ghysen, 1999). Se consideră că aceşti factori de

transcripţie controlează un program genetic proneural, care determină diferenţierea celulelor neuroepiteliale în neuroni, oricare ar fi localizarea acestora în neurax. Proteinele BHLH sunt clasificate, pe baza ortologiei cu unii factori de transcripţie de la *Drosophila,* în două categorii: în prima categorie intră gene ca *Mash-l,* iar în cea de-a doua sunt incluse gene cum ar fi *neurogenina.*

Celulele care ies din ciclul celular şi sunt delaminate din zona ventriculară exprimă diferenţiat, în funcţie de locaţie şi momentul când ies din ciclul celular, aceşti factori de transcripţie. S-a confirmat că genele *Mash-l, Math-3* şi *NeuroD* au activităţi similare în mezencefal, rombencefal şi retină, putând determina celulele din zona ventriculară dorsală fetală să se diferenţieze în neuroni. La homozigoţii deficienţi pentru aceste gene, componentele embrionare neurale nu se formează (Olson & colab, 2001; Wang & colab., 2001). S-a observat că genele proneurale sunt induse în timpul perioadei de neurogeneză şi sunt reprimate în timpul perioadei care urmează, în care sunt produse celule gliale.

Un al treilea tip de celulă specific sistemului nervos central este reprezentat de oligodendrocite, celule care vor participa la mielinizarea axonilor. Aceste celule sunt produse în aria entopedunculară din telencefal şi migrează spre eminenţele ganglionare laterale şi mediale şi spre cortex (Tekki-Kessaris & colab., 2001). Specificarea diferenţierii lor depinde de semnale cum ar fi SHH şi factorul de creştere derivat din plăcuţe (PDGF, *plateletderived gr owth factor).* La diferenţierea oligodendrocitelor par să participe şi factori de transcripţie din familia BHLH, dat fiind că reducerea expresiei acestora reprimă diferenţierea acestor celule.

Evident, la specificarea fenotipului unui neuroblast dintr-o anumită regiune a sistemului nervos participă factori de transcripţie care sunt exprimaţi în neuromerele corespunzătoare. Astfel, Dlx-2 induce o enzimă, decarboxilaza acidului glutamic (GAD), care controlează rata sintezei acidului y-aminobutiric (GABA). Se ştia că Mash-l poate

Induce expresia Dlx-l, ceea ce sugerează că în specificarea neuronilor GABA-ergici din telencefal este implicată cascada de semnalizare Mash-l/Dlx-l/GAD, deşi se pare aceasta nu este singura cale de semnalizare (pentru detalii, vezi: Schuurmans & Guillemot,

2002). Cercetări recente indică faptul că neuronii GABA-ergici şi oligodendrocitele provin dintr-o populaţie de progenitori din telencefalul ventral (Monuki, Porter & Walsh, 2001).

O concluzie pe care o putem desprinde din neurobiologia moleculară a diferenţierii este că acest proces, nu depinde de un factor de transcripţie, ci de acţiunea conjugată a mai multe proteine cu diverse funcţii moleculare, în funcţie de contextul intracelular şi extracelular (Kininer, 2002).

Diferenţierea nu este inflexibilă. Există experimente prin care s-a arătat că, atunci când este inhibată expresia genelor *BHLH,* celulele neuroepiteliale au revenit la o stare primordială, recăpătându-şi posibilitatea de a se divide şi de a se diferenţia în neuroni *sau* celule gliale, în funcţie de semnalele din micromediul celular. Reglarea expresiei factorilor de transcripţie BHLH pare să fie mecanismul unei balanţe care păstrează echilibrul neuroepitelial între câte celule ies din ciclul celular şi se

I diferenţiază şi cele care continuă să se

Individă (Nieto & colab., 2001).

Referinţe bibâiografice:

Brunet, J.F., Ghysen, A. (1999) 1 *heonstructing cell determination:* I *troneural genes and neuronal identity.* ibioessays 21, 313 – 318

Kininer, C. (2002). *Neurogenesis în embryos and in adult neural stern cells.* J. Neurosci. 22, 639 – 643 Monuki, E.S., Porter, F.D., Walsh, C.A. (2001) *Patterning of the dorsal telencephalon and cerebral cortex by a roof plate-Lhx2 pathway.* Neuron 32, 591 – 604

Morrison, S.J., Pérez, S.E., Qiao, Z., Verdi, J.M., Hicks, C, Weinmaster, G., Anderson, D.J. (2000) *Transient Notch activation inițiate's an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stern cells.* Cell 101, 499 – 510 Nieto, M., Schuurmans, C, Brz, O., Guillemot, F. (2001) *Neural BHLH genes control the neuronal versus glial fate decision în cortical progenitors.* Neuron 29, 401 – 413 Olson, J.M., Asakura, A., Snider, L., Hawkes, R., Ştrand, A., Stoeck, J., Hallahan, A., Pritchard, J., Tapscott, S.J. (2001) *NeuroD_2 is necessary for development, survival of central nervous sistem neurons.* Dev. Biol. 234, 174 – 187

Schuurmans, C, Guillemot, F. (2002) *Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon.* Curr.

Opin. Neurobiol. 12, 26 – 34

Tekki-Kessaris, N., Woodroff, R., Hall, A. C, Gaffield, W., Kimura, S., Stiles.

C. D., Rowitch, D.H., Richardson, W.

D. (2001) *Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specification in the telencephalon.* Development 128, 2545 – 2554

Wang, S.W., Kim, B.S., Ding, K., Wang, H., Sun, D., Johnson, R.L., Klein, W.H., Gan, L. (2001) *Requirement for math5 in the*

155

development of retinal ganglion cells. Genes Dev. 15, 24 – 29

cultivate cu mâoblaşti, precursori ai celulelor musculare scheletice, sau cu celule din miocardul de la şobolani nou-născuţi, acestea se diferenţiază conform semnalelor din cultură în celule musculare scheletice, respectiv, miocardice.

Cortex occipital

Cerebel

BOA

SCM

Fig. 3.14 *Secţiune sagitală prin creierul şobolanului în perioada neonatală, pe care se observă reţeaua migratorie rostrală (RMS).* BO (a), bulb olfactiv (anterior); ce, corp calos; hip, hipocamp; SCM, strat al celulelor mitrale; SG, strat granular; VI, ventriculi laterali; ZSV a, zonă subventriculară anterioară. (Modificat după Yang & colab., 2000)

Problema transdiferenţierii este încă intens dezbătută şi are nevoie de conceperea unor experimente specifice, dar am abordat acest subiect pentru că, o dată în plus, tragem concluzia că o celulă diferenţiată este o celulă care, exprimând anumite gene, poate răspunde selectiv la anumite semnale din micromediul celular. Dar, aşa cum vom vedea, celula îşi poate reactualiza în anumite condiţii genomul; astfel că posibilitatea transdiferenţierii sale este verosimilă teoretic. Genele nu sunt încuiate în celulă. Celula trăieşte, se adaptează mediului celular şi îşi reactualizează genomul activ, adică genele pe care le exprimă, în funcţie de semnalele pe care le preia. Celulele suşe neuronale şi neuronii nu fac excepţie de la aceste reguli. Diferenţierea celulară s-ar putea dovedi în anii următori o stare reversibilă în prezenţa unor semnale corespunzătoare (pentru o discuţie, vezi: Wurmşer & Gage, 2002).

Am notat că s-a considerat iniţial că progenitorii celulelor suşe

neuronale din zona subventriculară fie suferă apoptoză (Smart, 1961), fie se diferenţiază exclusiv pe linia glială (Luskin, 1993). Există însă dovezi că aceşti progenitori migrează spre locaţii din creier privilegiate neurotrofic, cu o rată de turnover mare. Astfel, cercetările conduse de A. Alvarez-Buylla de la Universitatea Rockefeller au demonstrat că zona subventriculară este organizată ca o reţea de lanţuri tangenţiale de precursori neuronali ce migrează pe o cale denumită reţea migratorie rostrală

156

(RMS, *rostral migratory stream)* spre bulbul olfactiv (vezi: Fig. 3.14). Precursorul embrionar al RMS se consideră că este o extensie a ventriculilor laterali prezentă de-a lungul bulbilor olfactivi în dezvoltare. Acest traseu pe care migrează neuroblaştii din zona subventriculară spre bulbul olfactiv reprezintă un sistem experimental în care pot fi studiate atât migrarea fără platformă glială, adică migrarea tangenţială, cât şi capacitatea de regenerare a sistemului nervos central.

Majoritatea lanţurilor de precursori neuronali sunt orientate paralel cu axul longitudinal al ventriculilor laterali. Lăţimea lanţurilor este, în medie, de diametrul a zece celule, lanţurile din partea dorsală a peretelui lateral fiind cele mai groase. Lanţurile din partea ventrală sunt mai subţiri, celulele se grupează mai strâns şi intră în reţeaua migratorie rostrală. Această organizare a zonei subventriculare poate fi pusă în evidenţă încă din ziua postnatală P 10 la şoareci (Doctsch & Alvarez-Buylla, 1996). Aceşti precursori migrează în lanţ, fără ghizi gliali radiali, ceea ce defineşte un al doilea tip de migrare (migrare tangenţială) a progenitorilor neuronali (vezi: mai sus). Acest tip de migrare a fost identificat şi în cortexul cerebral fetal, dar şi perinatal, în zona subventriculară dorsală sau eminenţele ganglionare (Reid, Liang & Walsh, 1995). Progenitorii neuronali angajaţi în reţeaua migratorie rostrală prezintă forma polisialată a moleculei de adeziune celulară neuronală (N-CAM-PS), astfel că pot fi vizualizaţi imunocitochimic cu ajutorul unor anticorpi specifici (vezi: Caseta 3. C). Ei se pot diferenţia în celule gliale, dar majoritatea adoptă o diferenţiere neuronală. Mecanismele pe care se bazează migrarea tangenţială includ factori de chemoafinitate, dar, convergent şi cu prezenţa moleculei de adeziune celulară neuronală (N-CAM), mai importante par a fi interacţiunile celulare homotipice. Progenitorii

neuronali migrează 5 – 8 mm rostral, parcurgând aprox. 3 – 5 um/h, iar, când ajung la nivelul bulbului olfactiv, ei ies din reţeaua migratorie rostrală şi se diferenţiază mai ales în neuroni granulari, dar şi în neuroni periglomerulari (Lois & Alvarez-Buylla, 1994).

Până de curând, nu au existat dovezi pentru existenţa RMS şi a migrării tangenţiale neurofile în creierul adult al mamiferelor microsmatice. Exista posibilitatea ca numai la rozătoarele macrosmatice, adică acele animale nocturne la care bulbul olfactiv este proeminent şi informaţiile olfactive au un rol adaptativ deosebit, să fie prezentă o cale migratorie limitată pentru neuroblaşti spre bulbul olfactiv. Primatele prezintă un bulb olfactiv de dimensiuni mai mici, cu pedunculi olfactivi mai lungi de – 20 mm. Reţeaua migratorie rostrală a fost identificată însă şi la primatele microsmatice, conţinând celule N-CAM-PST (Kornack & Rakic, 2001). Foarte interesant, neuroblaştii din RMS sunt înconjuraţi de grupuri de celule gliale ce ar putea delimita direcţia lor migratorie, aceştia nefiind semnalaţi în substanţa albă adiacentă cortexului sau în zona striată sau septală. O dovadă indirectă pentru data naşterii neuronilor granulari şi periglomerulari şi originea lor în afara bulbului olfactiv o constituie prezenţa lor, identificată la un interval semnificativ (75 zile) după injectarea markerului mitotic în zona subventriculară.

Studiile care au investigat diferenţierea neuroblaştilor ce migrează pe RMS oferă dovezi că progenitorii astrocitari de pe această cale sunt bi (pluri) potenţi, putând genera şi neuroni. Aceste argumente se alătură altor studii care susţin că

Caseta 3.C
CARACTERISTICILE CELULELOR
CREIERUL PERINATAL
NCAM-PS + IZOLATE DIN

Progenitorii din reţeaua migratorie rostrală din creierul adult al rozătoarelor, cât şi al primatelor, sunt imunopozitivi pentru forma polisialată a moleculei de adeziune celulară neuronală (NCAM-PS) care este exprimată de majoritatea celulelor din sistemul nervos central în faze de diferenţiere timpurii, şi are un rol important în migrarea neurofilică a neuroblaştilor spre bulbul olfactiv. Astroc iţele de tip 1 apar prin diferenţierea unor astroblaşti derivaţi din precursorii din zona subventriculară în timpul dezvoltării embrionare

târzii/perinatale timpurii. Astrocitele de tip 2, ca şi cele de tip 1, sunt imunopozitive pentru markeri gâiali (GFAP +), dar sunt recunoscute specific de anticorpii monoclonali A_2B5 (Raff, 1989; Ben-Hur & colab., 1998).

Gliogeneza continuă şi în perioada perinatală, o problemă de elucidat fiind dacă oligodendrocitele şi astrocitele au acelaşi precursor glial. Majoritatea studiilor au investigat un progenitor. bipotent glial izolat din nervul optic, numit oligodendrocit-astrocit de tip 2 (O-A2). În contextul în care unele studii arată că astrocitele din zona subventriculară din creierul adult sunt multipotente, este cu atât mai importantă caracterizarea fazelor dintre celula suşă neuronală multipotentă şi progenitorul bipotent O-A2.

Precursori ai O-A2 au fost izolaţi din culturi de celule gliale prelevate în perioada perinatală, extinse mai ales în prezenţa factorului de creştere derivat din plăcuţe (PDGF) şi exprimând NCAM-PS (Grinspan & Franceschini, 1995). Aceşti precursori, ca şi celulele suşe neuronale, proliferează şi în prezenţa unor mitogeni ca FGF şi EGF şi formează în mediile de suspensie agregate ce seamănă cu neurosferele. Progenitorii exprimă şi gena ce codifică receptorii pentru hormoni tiroidieni. Astfel, adăugarea în cultură a formei active a hormonului tiroidian T3 promovează diferenţierea acestor progenitori în special în astrocite şi oligodendrocite. T3 nu este necesar pentru reînnoirea sau diferenţierea celulelor suşe neuronale, astfel că celulele NCAM-PS + reprezintă o populaţie de progenitori mai restricţionaţi, bipotenţi. Deci apariţia celulelor NCAM-PS + în perioada perinatală ar putea coincide cu restricţionarea majorităţii precursorilor din creier pe linia glială. Aceste celule diferă de neuroblaştii NCAM-PS" **1**" ce migrează de-a lungul reţelei migratorii rostrale în creierul adult (pentru o sinteză, vezi: Goldman, 1996 sau Price, 1994).

Referinţe bibliografice:

Ben-Hur, T., Rogister, B., Murray, K, Rougon, G., Dubois-Dalcq, M. (1998). *Growth and fate of PSA-NCAM precursors of the postnatal brain.* J. of Neurosci., 18, 5777 – 5788 Goldman, J.E. (1996). Developmental origins of astrocytes. În: Jessen, K.R., Richadson, W.D. (Eds.). *Glial cett development* (pp. 31 – 51). BIOS Scientific Publishers, Oxford

Grinspan, J.B., Franceschini, B. (1995).
Plateletderived growth factor is a survivai factor for PSA-NCAM

oligodendrocyte preprogenitor cells. J. Neurosci. Res., 41, 540 – 551

Price, J. (1994). *Glia! cell lineage and development.* Curr. Opin. Neurobiol., 4.

680 – 686

Raff, M.C. (1989). *Glial cell diversification in the rat optic nerve.*

Science, 243, 1450 – 1455

astrocitele ar putea fi precursori neuronali (Alvarez-Buylla, Theelen & Nottebohm, 1990; Malatesta, Hartfuss & Gotz, 2000; Chanas-Sacre et al., 2000). Ştim deja că celulele gliale radiale sunt generate timpuriu în histogeneză, înaintea valurilor de neurogeneză, pentru a asigura ghidarea neuroblaştilor şi formarea unităţilor radiale. Se credea că, după terminarea neurogenezei fetale continuată şi în perioada perinatală, celulele gliale radiale dispar sau devin astrocite (Misson, Takahashi & Caviness, 1991). S-a demonstrat de curând că celulele gliale radiale evidenţiate între zilele embrionare E 15-E 16 pot genera şi neuroni (Noctor & colab., 2001). Un argument în plus pentru această relaţie clonală între celulele gliale radiale şi neuroni este expresia genei *Notch* care menţine precursorii activi proliferativ, inhibiţia expresiei acestei gene promovând diferenţierea neuronală. În timpul corticogenezei, *Notch* se asociază cu fenotipul celulelor gliale radiale (vezi: mai sus).

În ultimii ani, s-a închegat o concepţie mai clară despre celulele suşe neuronale din zona subventriculară. Zona subventriculară conţine neuroblaşti (celule de tip A) ce migrează pe tuburi gliale formate de procesele progenitorilor astrocitari (celule de tip B) cu un ciclu de diviziune lent. De-a lungul lanţurilor de celule ce migrează se găsesc şi grupuri de precursori (celule de tip C) care proliferează rapid… La şoareci adulţi, s-a produs degenerarea celulelor de tip C şi B prin administrarea intracerebrală a unui antimitotic puternic (Ara-C, citozină-P-D-arabinofuranozidă). S-a observat că zona subventriculară/RMS se regenerează secvenţial şi s-a urmărit ordinea reapariţiei celor trei tipuri de celule prezente în aceste locaţii (Doctsch, García-Verdugo & Alvarez-Buylla, 1999). După injectarea antimitoticului, celulele de tip C şi A au dispărut complet. Celulele de tip B şi celulele ependimale sunt singurele care au supravieţuit în proporţie de 55%, respectiv, 37%. Celulele de tip B identificate prezintă un cil unic care se prelungeşte spre zona ventriculară, supravieţuirea lor putând depinde de contactul cu lichidul

cefalo-rahidian din ventriculii laterali. Ele nu sunt însă celule ependimale pentru că acestea din urmă au o morfologie multiciliată cu un citoschelet specific de tip 9 + 1 microtubuli şi, mai mult, sunt imunopozitive pentru markeri specifici astrogliei. Celulele de tip B descrise se aseamănă mai degrabă cu celulele neuroepiteliale unipolare, cu un cil unic căruia îi lipseşte o pereche centrală de microtubuli. Celulele de tip B care au supravieţuit, dar nu şi celulele ependimale, au activitate mitotică, fiind JH-timidină pozitive. Ele refac zona subventriculară/RMS, apărând grupuri izolate de celule NCAM-PS + după 4, 5 zile

de la injectarea antimitoticului, regenerarea completă fiind semnalată la – 30 de zile.

Deci celulele de tip B sunt multipotente, putând genera atât celule de tip C, cât şi celule de tip A. Dacă astrocitele sunt multipotente, nu înseamnă că în zona subventriculară nu există celule suşe neuronale propriu-zise. Astrocitele ar putea fi mai rezistente la substanţe antimitotice ca Ara-C, regenerarea bazându-se în cazul acesta pe astrocitele multipotente. O explicaţie pentru multipotenţa astrocitelor din zona subventriculară ar fi producerea unui proces de de-diferenţiere. Astrocitele posedă global proprietăţi multipotente până la ziua postnatală Pil, după care doar astrocitele din zona subventriculară mai conservă aceste proprietăţi, probabil, datorită unor condiţii neurotrofice locale. Această explicaţie este susţinută de faptul că astrocitele prelevate din cortexul cerebral, cerebel, măduva spinării şi zona subventriculară între P 7-ţi 14 iniţiază *in vitro* neurosfere, deci, sunt clonogenice şi multipotente dacă mediul conţine EGF (Leywell & colab., 2000).

O parte din progenitorii neuronali din zona subventriculară migrează pe reţeaua migratorie rostrală spre bulbul olfactiv. Dar s-a arătat că o altă zonă mitogenic activă pe tot parcursul vieţii, la diferite specii, este girusui dinţat din hipocamp (Lopez-Garcia ei al, 1988; Nottebohm, 1989; Cameron & McKay, 1999; Eriksson et al., 1998). Progenitorii neuronali se agregă în stratul granulai şi zona subgranulară din girusui dinţat şi îşi extind tipic procese ce fac sinapsă cu neuronii piramidali mari din câmpul CA3 din cornul lui Ammon (Kornack & Rakic, 1999; Hastings & Gould, 1999). O parte din aceşti progenitori suferă apoptoză, fiind astfel eliminate celulele

supranumeroase (Biebl & colab… 2000). Supravieţuirea progenitorilor poate fi favorizată de infuzarea locală a FGF, dar şi de condiţii ecologice cum ar fi posibilităţile exploratorii la şobolani sau învăţarea, respectiv, prezenţa estrogenilor (Wagner, Black & DiCicco-Bloom, 1999; Tanapat & colab., 1999). Neurogeneza în girusui dinţat pare să fie relevantă funcţional şi comportamental, reducerea numărului de progenitori în această zonă prin injectarea unei toxine numită AMM (acetat de metilazoximetanol) reducând semnificativ performanţa şobolanilor la sarcini de învăţare hipocamp-dependente, cum ar fi condiţionarea fricii (pentru detalii, vezi: Le Doux, 1998 şi referinţele), dar nu şi la sarcini de învăţare ce nu corelează cu integritatea/activarea hipocampului (Shors & colab., 2001). Relaţia dintre neurogeneza şi învăţare este confirmată electrofiziologic prin faptul că la progenitorii neuronali care se agregă în girusui dinţat se observă o facilitare a potenţării de lungă durată (Van Praag & colab., 1999).

Neurogeneza adultă nu este limitată doar la zona hipocampului şi zona subventriculară/bulbul olfactiv. Încă din 1963, J. Altman indica producerea de noi neuroni şi în neocortexul adult la rozătoare şi pisici. Studii mai recente confirmă neurogeneza adultă în izocortexul primatelor, mai ales în cortexul prefrontal şi cortexul temporal inferior (Gouid & colab., 1999 b). Este posibil ca cercetările anterioare care nu au confirmat producerea de noi neuroni în aceste zone ale izocortexului din creierului adult să fi folosit doze prea mici de markeri mitotici care, datorită unor diviziuni celulare rapide succesive, să se fi redus la niveluri

neidentificabile în celule individuale. Progenitorii neuronali au putut fi identificaţi în zona subventriculară şi în substanţa albă din secţiunile frontale. Neuronii postmitotici semnalaţi în izocortex ar putea fi, deci, derivaţi din populaţii locale de progenitori sau ar putea origina în zona subventriculară, această ultimă ipoteză dispunând de dovezi preliminare (Gould & colab., 2001).

Un studiu foarte recent arată că neuroni nou produşi în zona subventriculară adiacentă vârfului rostral al porţiunii ventrale a cornului temporal al ventriculilor laterali migrează spre complexul amigdalian şi, mai ales, spre partea sa latero-bazală, dar şi în cortexul piriform (Bernier & colab., 2002). Mai mult, reţeaua migratorie

rostrală nu este singura cale de migrare tangenţială. Aceşti neuroni care se agregă în structurile profunde ale lobului temporal, mai sus menţionate, migrează tangenţial pe o cale numită reţeaua migratorie temporală (TMS). Ei exprimă o genă numită *Bel-2*, care se ştie că ar coda un factor antiapoptotic (vezi: următorul paragraf) ce accelerează maturarea neuroblaştilor şi participă la diferenţierea neuronală. Autorii consideră că funcţia acestor neuroni ar putea fi indicată de faptul că amigdala şi cortexul piriform primesc proiecţii de la bulbul olfactiv, adăugarea de noi neuroni fiind, poate, coordonată de un factor cum *st fi Bel-2.*

Lecţia pe care ne-o oferă neurogeneza în creierul adult este că, după încheierea morfogenezei sistemului nervos central, creierul şi măduva spinării nu sunt în întregime postmitotice. Creierul adult păstrează populaţii de celulele clonogenice şi pluripotenţiale în zona subventriculară a ventriculilor laterali şi în zona subgranulară a girusului dinţat din hipocamp, dar se presupune că ar exista populaţii locale de precursori neuronali şi în izocortex. Aceste populaţii de celule suşe sau progenitori restricţionaţi (celule care se mai pot divide, dar nu se mai pot diferenţia decât într-un singur tip de celulă) generează celule pentru bulbul olfactiv, girusui dinţat şi chiar anumite zone din izocortex. Dar care este rolul acestor neuroni? E puţin probabil ca creierul să îşi fi dezvoltat acest mecanism pentru recuperarea unor leziuni nervoase care au produs depleţie celulară (Nottebohm, 2002). Experimente ca cele citate mai sus sugerează o relaţie între performanţa în anumite tipuri de sarcină de învăţare şi neurogeneza hipocampică (Kemperman & Gage, 1999). Un corolar al acestei constatări ar fi că învăţarea solicită reorganizarea reţelelor neuronale cu adăugarea de noi neuroni. Această teorie e puţin cam radicală pentru cei care consideră că sinapsa este un instrument celular suficient pentru învăţare (Greenough, Cohen & Juraska, 1999). Oricât de radicală, sugestia rămâne pentru că este probată de date experimentale preliminare. O ipoteză a lui F. Nottebohm ar fi că:

„Pentru anumite tipuri de neuroni, dar nu în mod necesar pentru toţi, achiziţia unei memorii de lungă durată ar putea fi o proprietate unică, învăţarea anterioară împiedicând învăţarea ulterioară. Aceşti neuroni, şi nu sinapsele lor individuale, ar fi unitatea memoriei de lungă durată şi numărul neuronilor care ar putea fi modificaţi de această manieră ar determina cât poate fi învăţat şi

reamintit". (Nottebohm, 2002, pp. 627)

161

O astfel de teorie celulară a învăţării este falsificaţiilă, dar este imatur să fie considerată verosimilă. În fond, ortodocşii neurobiologiei celulare susţin pe bună dreptate că, odată cu neurogeneza adultă, trebuie să explicăm în primul rând de ce acest proces este limitat la zone specifice (B. L. Finlay, comunicare personală), deşi studii recente arată agregarea neuronilor nou produşi în zone extinse ale izocortexului.

G. Kemperman, un alt cercetător implicat în studierea neurogenezei adulte, lansează o teorie mai integrativă, după care neurogeneza adultă este legată de chiar funcţia hipocampului (Kemperman, 2002). Modele recente ale învăţării susţin că hipocampul şi izocortexul funcţionează serial, hipocampul integrând aspectele senzoriale polimodale ale unei memorii şi transferând acest model izocortexului care ar susţine memoria de lungă durată (McClelland, McNaughton & O'Reilly, 1995; McCJelland & Goddard, 1996; O'Reilly & Rudy, 2001). Aceste modele sunt limitate pentru că pornesc de la presupunerea unei specializări a doua module de învăţare: o platformă temporară reprezentată de hipocamp şi un modul pentru stocarea de lungă durată, la nivelul izocortexului. Din perspectiva acestui model, producerea neurogenezei în zone limitate cum ar fi hipocampul este de înţeles: reţelele neuronale din această structură trebuie să fie foarte plastice pentru că ele elaborează un model de modificări celulare corespunzător unui pattern de stimuli care sunt integraţi într-o memorie. După elaborarea acestui model de activare, reţelele neuronale din hipocamp sunt pregătite pentru o nouă „sesiune" prin integrarea unor noi neuroni. Printr-o analogie cu memoria sistemelor artificiale, neurogeneza adultă asigură refacerea unităţilor de RAM *(random access memory,* memorie de lucru) (Kemperman, 2002). Dar predicţiile unei astfel de teorii trebuie testate. Ar fi interesant să se verifice dacă, de pildă, există o relaţie lineară între performanţa la sarcini de învăţare spaţială care sunt dependente de hipocamp şi agregarea neuronilor nou-produşi. Analize cantitative ale neurogenezei din telencefalul adult sunt esenţiale pentru conturarea unui rol funcţional al acestui proces.

Aşa cum remarca F. Gage, demonstrarea existenţei celulelor suşe neuronale în creierul adult nu a fost pe deplin integrată în

conceperea creierului (Gage, 2002). Ca să vă convingeţi, încercaţi să întrebaţi un coleg, în timpul unui curs de chimie, dacă ar crede că 10.000 de neuroni îi aleargă în acel moment prin substanţa albă către hipocamp şi izocortex?! Pe de altă parte, entuziasmul catalizează teorii fundamentaliste care, de multe ori, nu se probează (pentru o discuţie, vezi: Nowakowski & Hayes, 2001). Chiar E. Gould atrage atenţia că:

„Cum s-a întâmplat în trecut şi cu alte progrese în ştiinţa fundamentală, pare să existe un grad mare de nerăbdare în a sugera că acest fenomen va oferi răspunsuri la o gamă largă de probleme anterior insurmontabile. […] La acest moment, acceptarea generală a neurogenezei adulte la mamifere după aproape 40 de ani de la descrierea sa iniţială este un motiv suficient pentru a sărbători" (Gould & Gross, 2002)

Recapitulând, am expus aceste studii despre neurogeneza adultă pentru a ne da seama că dogma care considera că toţi neuronii se formează în perioada

embrionară şi neonatală, migrează şi se diferenţiază pentru a forma citoarhitecturi nu este riguroasă. Procesele care au loc în perioada morfogenezei depind de factori epigenetici, cum ar fi factorii de creştere, care pot persista în anumite zone ale creierului adult. Aceste surse locale de morfogeni ar putea menţine pluripotenţialitatea celulelor suşe neuronale din zona subventriculară, de exemplu. Neurogeneza adultă este o temă care ne provoacă o reflecţie importantă asupra dinamicii creierului şi care se alătură altor tipuri de adaptare neuronală care sunt în paralel cu flexibilitatea comportamentală şi cu dinamica mediului nonstaţionar. Neuroştiinţele contemporane oferă o diversitate covârşitoare de cercetări care susţin că dezvoltarea sistemului nervos central, limitată clasic la perioada embrionară/perinatală timpurie, şi învăţarea nu sunt decât două manifestări ale plasticităţii neuronale.

3.3.2 Proprietăţile celulelor suşe

După ce Altman argumenta pentru prima dată în 1962 o teză „tare" a plasticităţii structurale a creierului adult prin descrierea neurogenezei adulte, au apărut studii care indicau că, în diverse zone ale creierului, neuronii îşi extind procese şi îşi reorganizează sinapsele după leziuni nervoase (Raisman, 1969; Moore, Bjorklund & Stenevi, 1971; Lynch, Deadwyler & Cotman, 1973). Mai recent, s-a arătat că

axonii din substanţa albă se pot regenera în absenţa ţesutului cicatricial (Davies & colab, 1997), contrar studiilor care afirmau că mielina ar suprima neuroregenerarea (pentru o sinteză, vezi: Schwab, Kapthammer & Bandtlow, 1993). În acest corp de studii, neurogeneza adultă şi existenţa celulelor suşe neuronale înlătura concepţia tradiţională conform căreia sistemul nervos central nu se regenerează (Ramón y Cajal, 1911).

Dacă există celule suşe neuronale, acestea pot fi prelevate, extinse în culturi pentru a fi o sursă pentru neurotransplant în cazul unor leziuni sau boli care produc depleţia neuronală. În acest context, asistăm la o adevărată explozie de cercetări care investighează terapia celulară. Studiile de pionierat în acest domeniu au fost efectuate de A. Bjorklund şi F.H. Gage care au arătat că, în cazul unor leziuni, creierul şi măduva spinării adulte permit supravieţuirea grefelor, diferenţierea şi agregarea celulelor transplantate (pentru o sinteză, vezi: Bjorklund & Gage, 1985 sau Dunnett & Bjorklund, 1994). Dovedirea existenţei celulelor suşe în creierul adult a beneficiat, totodată, şi de perfecţionarea metodelor de stabilire şi menţinere a culturilor celulare de lungă durată. Terapia celulară este, actualmente, unul din punctele fierbinţi ale neuroştiinţelor şi o problemă asupra căreia dezbat biologia moleculară şi celulară, biotehnologia şi bioetica. Această problemă ar putea fi la fel de bine tratată în volumul următor ale excursiei noastre prin neuroştiinţe, dar profităm de contextul pe care l-am creat prin extensia unor procese tradiţional asimilate dezvoltării sistemului nervos în viaţa adultă. Grila de lectură şi justificarea integrării acestui subiect aici este ceea ce am exemplificat până acum că creierul adult pare să păstreze capacitatea de a accepta, dacă nu chiar şi de a participa, la reorganizarea sa structurală şi funcţională motivată de

comportament sau produsă de lezarea sa (vezi şi: Gage, 2002). Vom arăta în continuare cum neurogeneza adultă şi celulele suşe neuronale s-au dovedit progrese-cheie pentru dezvoltarea terapiei celulare.

Deşi destinaţia preferenţială a progenitorilor derivaţi din celulele suşe din zona subependimală este bulbul olfactiv, s-a arătat că este posibilă redirecţionarea lor experimentală către alte regiuni caracterizate-ca non-neurogenice (Fallon & colab., 2000). Astfel,

celulele suşe neuronale pot fi nu numai un model pentru descrierea moleculară a diferenţierii celulare, dar pot fi folosite şi pentru terapia celulară în tulburări degenerative sau alte evenimente care duc la pierderi masive de neuroni sau celule gliale. Totodată, grefarea viabilă a precursorilor neuronali şi dezvoltarea fenotipică a celulelor transplantate corespunzătoare nişei gazdă este o probă finală a pluripotenţialităţii celulelor suşe neuronale (Gage, 2000). Astfel de celule suşe neuronale pot fi prelevate, de pildă, din creierul unor fetuşi neviabili (Keyoung & colab., 2001). Precursorii neuronali pot fi izolaţi şi din bulbul olfactiv al unor pacienţi umani adulţi care au suferit anumite intervenţii neuro-chirurgicale invazive. Aceşti precursori sunt clonogenici şi pluripotenţi, putând fi o sursă de transplant autolog, adică al unei grefe rezultate din ţesut propriu prelevat şi extins în cultură (Pagano & colab., 2000). Alternativ, celulele suşe pot fi izolate şi din probe de ţesut de la biopsie sau necropsie, în acest ultim caz, celule pluripotente viabile putând fi prelevate într-un interval de până la 20 de ore după deces.

Celulele embrioblastului proliferează şi se diferenţiază pe parcurs în toate tipurile de celule care care vor popula organismul embrionului şi fătului. Celulele embrionare sunt pluripotenţiale şi constituie, deci, o altă sursă, în afara celulelor suşe neuronale de la făt, pentru obţinerea unor linii de celule clonogenice şi pluripotente (pentru o discuţie de bioetică, vezi: Caseta 3. D). Aceleaşi proprietăţi le prezintă şi celulele germinative embrionare, adică precursorii celulelor sexuale, derivate din celulele germinative primare izolate din crestele gonadale şi mezenteriul embrionar. Atât celulele suşe embrionare (CSE), cât şi celulele germinative embrionare (CGE) proliferează nelimitat în cultură în prezenţa anumitor factori de creştere (de pildă, factorul leucemie inhibitor, LIF, *leukemia inhibilory factor)* şi se pot diferenţia în diverse tipuri de celule ale celor trei straturi germinative embrionare.

Un alt model al diferenţierii celulare îl oferă celulele canceroase embrionare (CCE), care sunt celule clonogenice, mai mult, celule „nemuritoare" cu un număr nelimitat de diviziuni şi pluripotente, izolate din teratocarcinoame (pentru detalii, vezi: McKay, 2000). *In vitro,* aceste celule proliferează rapid, dar îşi modifică profilul antigenic, pierzând antigeni embrionari specifici celulelor embrionare (pierderea SSEA-3, 4 şi TRA-1 – 60, 81**1**, dar facilitarea expresiei

SSEA-1

2 Embrioblastu! este aglomerarea de celule din cavitatea blastocistului, din care vor deriva toate organele embrionare, mărginită de un strat de trofoblaşti care va da naştere la structurile extraembrionare.

1 SSEA (în engl. *stage-specifte embryonic antigen)*, antigeni celulari specifici unei etape de dezvoltare embrionară. TRA-1 – 6081, glicoproteine de greutate moleculară mare.

164

şi alcalin-fosfatazei). Semnificaţia funcţională a acestor antigeni nu este cunoscută (Thomson & Marshall, 1998). Atunci când sunt injectate la şoareci imunodeficienţi, aceste celule se diferenţiază în celule ale celor trei straturi germinative (ectoderm, mezoderm, endoderm), dar generează fenotipuri mai puţin diverse decât celulele suşe embrionare şi sunt aneuploide, spre deosebire de celulele suşe embrionare care au un cariotip normal.

Celulele embrioblastului şi ale epiblastului sunt, în general, sursa derivării unor linii de celule suşe embrionare de la rozătoare, respectiv, primate şi oameni. Celulele suşe pot fi derivate din blastocişti întregi, numai că, pentru ca o cultură să fie cât mai omogenă, s-a căutat ţesutul embrionar care permite derivarea directă şi eficientă a celulelor suşe. Dezvoltarea embrionară la şoareci, faţă de primate şi oameni, este diferită prin structura şi funcţia membranelor fetale şi placentei. Aşa s-ar putea explica de ce, la şoareci, liniile de CSE pot fi derivate şi mai târziu, din ectodermul primitiv, în timp ce la primate şi om, acestea sunt cel mai eficient derivate din embrioblast (Odorico, Kaufman & Thomson, 2001).

S-a observat că, la şoareci, celulele suşe pot fi derivate mai eficient din blastocişti preimplantaţionali (azonali), a căror nidare a fost întârziată prin ovarectomie efectuată în a treia zi de sarcină (Evans & Kaufman, 1981; Brook & I Gardner, 1997). Se presupune că dacă celulele sunt prelevate după nidare, eficienţa derivării de celule suşe este mai redusă datorită unei influenţe inhibitorii exercitate de hipoblast asupra epiblastului. Această influenţă inhibitorie ar putea consta în făptui că hipoblastul semnalizează diferenţierea terminală a celulelor epiblastului (vezi: capitolul anterior). Rata populaţională de diviziune a acestor celule suşe embrionare izolate de la şoareci este de12 ore.

Prima linie de celule suşe embrionare derivată de la primate (*Maccacus thessus)* este R278, 5, izolată din embrioblast (Thomson & colab., 1995). Celulele acestei linii proliferează intens *in vitro* o 1 an) în prezenţa LÂF sau FGF şi sunt tutipotente. Celulele suşe embrionare umane (liniile H 9, 1 şi H 9, 2) au fost izolate din embrioni donaţi explicit în scopuri clinice, înainte de legiferarea unor restricţii etice cu privire la utilizarea în cercetare a embrionilor umani (Amit & colab., 2000; vezi: Caseta 2. D). Aceste celule au o rată de diviziune medie de – 36 de ore şi, spre deosebire de celulele suşe embrionare de la şoareci, pentru care LÂF este suficient pentru menţinerea proliferării fără diferenţierea celulelor, acestea necesită prezenţa unui strat trofic de fâbroblaşti. Studii recente arată că influenţa mitogenică afibroblaştilor se exercită prin intermediul unui factor autocrin/paracrin. Forma N-glicosilată a cisâatiriei C (Cg) este un factor autocrin/paracrin care, împreună cu factori trofici ca FGF, asigură proliferarea nediferenţiată a celulelor suşe (Taupin & colab., 2002). Capacitatea de extindere nelimitată *in vitro* a celulelor suşe embrionare este corelată cu expresia telomerazei, enzima a cărei activitate este corelată cu menţinerea lungimii telomerelor după cicluri mitotice repetate, la niveluri ridicate, relativ constante (vezi: paragraful final al acestui capitol).

Celulele germinative embrionare izolate din crestele gonadale şi mezenteriul de la embrioni între a 5-a şi a 9-a săptămână după fecundaţie prezintă proprietăţile celulelor suşe. Profilul antigenic al acestor celule embrionare diferă

Caseta 3.D

CELULELE SUŞE, BIOTEHNOLOGIA ŞI BIOETICA

Celulele suşe umane sunt o posibilă sursă de terapie celulară în boli degenerative ca Alzheiraer, Parkinson sau Huntington, în tratarea leucemiei sau a altor tulburări maligne sau non-maligne. De asemenea, experimente preliminare indică eficienţa transplantului de celule suşe pentru recuperarea deficitului motor după pareze sau în scleroza laterală amiotrofică. Celulele suşe embrionare sunt, datorită posibilităţii lor de autoreânnoire nelimitată, sursa cea mai valoroasă pentru aceste terapii celulare. Aceste celule sunt prelevate de la embrioni umani preimplantaţionali rezultaţi în urma fertilizării *in vitro* ce au fost donaţi explicit în scopuri de cercetare sau de la fetuşi umani

neviabili.

Biotehnologia izolării proliferării *in vitro* a celulelor suşe umane este astăzi licitată de cele mai mari firme particulare de profil. De pildă, cercetările conduse de J. Thomson prin care au fost descrise metodele de cultivare pe termen lung a celulelor suşe embrionare şi ale grupului lui J. Gearhart de la Universitatea John's Hopkins asupra celulelor suşe fetale sunt finanţate în cea mai mare parte de corporaţia Geron**1M** din California. Finanţarea din fonduri private intervine în contextul unor controverse bioetice care au blocat majoritatea fondurilor publice pentru cercetări ce utilizează celule suşe embrionare sau fetale umane. Sintetic, aceste controverse sunt legate de a decide dacă embrionii umani în faza de blastocist sunt sau nu vii şi trebuie să beneficieze de drepturile acordate unei fiinţe umane.

În Marea Britanie, prelevarea de celule suşe de la embrioni umani rezultaţi în urma fertilizării *în vitroi* şi chiar de la embrioni creaţi special pentru cercetare a fost mult timp interzisă, singura cale legală fiind de a obţine celule suşe pentru cercetare fiind importarea acestora. În momentul de faţă, atât în Marea Britanie, cât şi în Franţa, aceste interdicţii au fost ridicate ca urmare a numeroaselor moţiuni înaintate de reprezentanţii asociaţiilor de pacienţi ce ar putea beneficia de terapia celulară.

În Statele Unite, însă, astfel de cercetări sunt legale numai dacă sunt finanţate din fonduri private şi, mai recent, a fost permisă alocarea unor fonduri publice pentru cercetări ce folosesc cele peste 60 de linii de celule suşe embrionare umane deja izolate *in vitro.* Acest ultim compromis a fost făcut şi în urma unei moţiuni semnate de peste 80 de laureaţi ai Premiului Nobel pentru ştiinţe şi înaintată în 2001. Chiar şi în aceste condiţii, cercetătorii apreciază că reducerea diversităţii genetice a celulelor suşe umane folosite în scopuri clinice s-ar putea dovedi un pericol.

— În Germania, legile ce reglementează medicina reproducer*ii in vitro* nu permit folosirea embrionilor sau fetuşilor umani pentru cercetare.

În România, este interzisă cionarea fiinţelor umane, deşi textul de lege

166

nu specifică foarte precis limitele de cercetare a potenţialului terapeutic al celulelor suşe embrionare sau fetale umane.

Deşi legislaţia începe să fie mai permisivă peste tot în lume, o alternativă pentru terapiile celulare sunt celulele suşe neuronale izolate din creierul adult sau din diverse analize histologice sau intervenţii chirurgicale invazive.

Referinţe bibliografice:

Bradbury, J. (2001). *New source of neural-transplant cells found.* Lancet.

357, 1418

Cohen, P., Young, E. (2001).

Embryonic stern cell research. New

Scientist, 171, 11

Josefson, D. (2001). *Embryos created for stern cell research.* British Med. J.

323, 127

Lenoir, N. (2000). *Europe confronts the embryonic stern cell research challenge.* Science, 287, 1425 – 1426 Marshall E. (2000). *The business of stern cells.* Science, 287, 1420, 1421 Marvick, C. (2001). *President Bush sidesteps critics în stern cell debate.* British Med. J., 323, 357 Perry, D. (2000). *Patients voices: The powerful sound in the stern cell debate.* Science, 287, 1423

Young, F.E. (2000). *A time for restraint.* Science, 287, 1424

National Bioethics Advisory Comission. *Executive summary, Ethical issues în stern cell research.* (NBAC, Rockville, MD, sept. 1999)

(2001) (Editorial). *Facing facts: President Bush is a pragmatist afterall.* New Scientist, 171, 3 „* (2001) (Editorial). *Stern cell research: Drawing the line.* Lancet, 358, 163

prin expresia SSEA-1 (SSEA1, 3, 4 + /TRA-1 – 60, 81 + /AP +). Celulele germinative embrionare au un cariotip normal, sunt clonogenice, formând colonii sferice de progenitori nediferenţiaţi şi sunt pluripotente, putând genera celule specifice celor trei straturi germinative, deci, inclusiv neuroni şi celule gliale (Shamblott & colab., 1998). În acest sens, s-a arătat că progenitorii celulelor germinative embrionare exprimă gene asociate cu multiple linii celulare ce definesc o stare celulară primară, care poate astfel suporta influenţa unor factori de semnalizare intrinseci şi extrinseci în timpul, diferenţierii. Atunci când sunt lăsaţi să se diferenţieze, cei mai mulţi progenitori exprimă markeri specific neuronali, ceea ce oferă perspective încurajatoare pentru intervenţii de neurotransplant sau terapie

celulară (Shamblott & colab., 2001). Această diferenţiere „liberă" ar indica faptul că genele neuronale nu sunt prea „costisitoare"!

Atât celulele suşe embrionare, cât şi celulele germinative embrionare formează agregate de celule nediferenţiate şi diferenţiate în diverse etape atunci când sunt transferate de pe stratul trofic şi sunt înlăturaţi factorii mitogenici. Aceste agregate se numesc corpi embrioizi. Dezvoltarea *in vitro* a corpilor embrioizi recapitulează dezvoltarea embrionară preimplantaţională, de la faze în care corpii embrioizi seamănă cu morula până la etape în care se observă corpi embrioizi cu aspect cavitar şi cistic. Ceea ce diferenţiază dezvoltarea corpilor embrioizi de a

embrionilor preimplantaţionali este că primii generează asincron şi atopic o diversitate de precursori şi progenitori (Itskovitz-Eldor & colab., 2000).

3.3.3 Neuroregenerarea şi terapia celulară

Celulele suşe suscită un interes atât de susţinut în principal datorită potenţialului lor terapeutic în boli ale sistemului nervos central, care produc depleţie celulară. Astfel de boli degenerative sunt, de pildă, boala Parkinson, în care degenerează celulele dopaminergice din partea compactă a substanţei negre mezencefalice sau boala Alzheimer, în care depleţia neuronală este mult mai extinsă, printre primele structuri afectate fiind amigdala şi hipocampul (pentru detalii, vezi: Miu & colab., 2002 a, b; Miu & Olteanu, 2002). Raţionamentul terapiei celulare este simplu: dacă simptomele clinice, cum ar fi, în cazul bolii Parkinson, rigiditatea, tremorul, deficitul de iniţiere a mişcărilor ş.a., este asociat cu depleţia neuronală, atunci transplanturi de celule care ar putea repopula zona afectată ar permite recuperarea senzorio-motorie şi/sau cognitivă. Celulele destinate terapei celulare pot fi cultivate *in vitro* şi transplantate în structurile afectate ale sistemului nervos central (SNC).

Înainte de abordarea terapiei celulare prin înlocuirea celulelor degenerate, s-a încercat să se determine dacă SNC adult se poate regenera. Unele experimente păreau să indice, însă, că sistemul nervos central nu se poate regenera. S-a considerat mult timp că doar neuronii din sistemul nervos periferic (SNP) se pot regenera, aceştia fiind intrinsec diferiţi de cei din SNC. Primele dovezi împotriva acestei concepţii au indicat că neuroni izolaţi din SNC se pot regenera dacă

sunt transplantaţi în regiuni ale SNP, dar, în situaţia inversă, când neuroni din SNP sunt transplantaţi în SNC, regenerarea nu se mai întâmplă. Aceste rezultate au fost interpretate ca probă că nu neuronii sunt diferiţi prin trăsături intrinseci, ci că mediul celular din SNC nu permite regenererarea. Se ştia că, după o leziune, astrocitele proliferează local şi formează ţesut cicatriciai, sugerându-se că acesta reprimă regenerarea neuronală.

Alte ipoteze incriminau oligodendrocitele, celule secretoare de mielină care formează adevărate reţele cu neuronii pentru că o oligodendrocită poate mieliniza până la 40 de neuroni; în SNP, celulele omoloage oligodendrocitelor sunt celulele Schwann, acestea fiind considerate un substrat fizic mai permisiv pentru neuroregenerare pentru că ele mielinizează doar o porţiune a unui singur axon (Keynes, 1987; pentru o discuţie, vezi: Freed, Medinaceli & Wyatt, 1985). De aici, A.J. Aguayo şi colaboratorii au testat dacă axonii neuronilor din SNC nu s-ar putea regenera dacă le este oferită o platformă reprezentată de celule Schwann. Ei au lezat regiuni din trunchiul cerebral şi măduva spinării şi au „cablat" o porţiune de aproximativ 35 mm cu un capăt în trunchiul cerebral şi cu celălalt în măduva spinării. Experimentele au arătat că, după câteva luni, celulele din grefa de ţesut din SNP a început să regenereze, dar, când capetele au intrat în SNC, creşterea proceselor s-a oprit (David & Aguayo, 1981). Într-o altă procedură experimentală, nervul optic a fost secţionat şi, la capătul secţionat, au fost grefate porţiuni de 4 cm

de nerv periferic. Dacă celălalt cap al nervului periferic este extras din craniu şi nu vine în contact cu alt ţesut, se observă că, după două luni, axonii celulelor ganglionare au regenerat de-a lungul grefei de nerv periferic. Dacă acesta este plasat la nivelul coliculilor superiori din mezencefal, o ţintă tipică a tractului optic, numeroase celule se regenerează de-a lungul grefei până în coliculi (vezi: **Fig. 3.15;** Bray, Vidal-Sanz & Aguayo, 1987).

Segment de nerv periferic implantat

Colicui superior

Ochi

„Nerv optic original secţionat

Axoni ai celulelor ganglionare din retină care au crescut pe podul de neiv periferic în coiiculii superiori

Fig. 3.15 *Schema experimentelor lui Bray, Vidal-Sanz & Aguayo (1987).* (Modificat după Pinel, 1990)

Date fiind aceste rezultate care indicau faptul că potenţialul regenerativ al SNC nu poate compensa pierderea celulară masivă, o a doua abordare a bolilor degenerative a presupus înlocuirea prin neurotransplant a celulelor degenerate. În cazul bolii Parkinson, s-a arătat că neuronii dopaminergici pot fi obţinuţi în cultură din precursori izolaţi din mezencefalul ventral. Problema este că, atunci când aceste celule sunt transplantate în creier, circa 95% din acestea mor (Brundin, Isacson & Bjorklund, 1985). Transplanturi de precursori embrionari ai celulelor dopaminergice, prelevaţi de la şobolan, supravieţuiesc şi refac proiecţiile tipice ale substanţei negre (Bjorklund & Stenevi, 1979). Lezarea unilaterală a substanţei negre produce o mişcare de manej, adică o mişcare circulară spre partea lezată; acest simptom este recuperat după refacerea proiecţiilor dopaminergice ale părţii compacte a substanţei negre de către neuronii dopaminergici care provin din grefă (Freed & colab., 1980). Extragerea chirurgicală a grefei reinstalează simptomul de manej (Bjorklund & colab., 1980).

Numeroase experimente au indicat că ţesuturile embrionar şi fetal sunt surse optime pentru neurotranspâant, speculându-se că, odată ce este transplantată, grefa de neurepiteliu trece prin toate fazele diferenţierii şi promovează astfel regenerarea ţesutului gazdă şi având chiar un efect trofic (Stein, 1988). Astfel, dacă se transplantează o porţiune de cortex cerebelar embrionar în creier, celulele grefei vor prolifera, vor migra şi se vor diferenţia, integrându-se în citoarhitectura izocortexului (Das, 1971, 1980). Unele studii susţin însă că numai grefele homotipice, adică prelevate din aceeaşi citoarhitectura ca cea în care vor fi transplantate, pot supravieţui şi compensa efectul unei leziuni. Astfel, numai animalele cu leziuni în cortexul frontal care au primit o grefă de ţesut cortical

frontal (grefă homotipică) au recuperat deficitele la o sarcină de discriminare spaţială, spre deosebire de animalele cu acelaşi tip de leziune, dar care au primit grefe din cortexul cerebelar (grefă heterotipică) (Labbe & colab., 1983). Studii mai recente explică aceste rezultate oarecum surprinzătoare prin faptul că grefa conţinea, probabil, progenitori resticţionaţi (şi nu celule suşe pluripotente)

adică celule care se mai pot divide, dar care nu mai pot genera decât un tip de celulă şi care se află, deci, într-un stadiu intermediar între celula suşă multipotentă şi celula diferenţiată. Între aceşti progenitori restricţionaţi există diferenţe în funcţie de zona din care au fost izolaţi. De exemplu, numai progenitori restricţionaţi neuronali izolaţi din hipocamp pot genera neuroni piramidali specifici cornului lui Ammon. Astfel, clasa progenitorilor restricţionaţi neurononali poate fi împărţită în mai multe subclase, în funcţie de celula şi fenotipul pe care îl pot genera progenitorii.

Progenitorii izolaţi din zona subventriculară a telencefalului anterior dau naştere la neuroni GABA-ergici care se agregă în striatum. Progenitorii izolaţi din măduva spinării, atunci când sunt transplantaţi în zona subventriculară migrează fără suport glial, îşi extind procese, se diferenţiază, cei mai mulţi devenind colinergici, şi se agregă în structuri cum ar fi cerebelul, bulbul olfactiv, izocortexul frontal şi occipital. Ei migrează pe distanţe mai mari decât progenitorii izolaţi din zona subventriculară, ceea ce ar putea indica faptul că, în cazul progenitorilor restricţionaţi neuronali din măduva spinării, este facilitată recunoaşterea semnalelor necesare migrării (vezi: Yang & colab., 2000). Deci, între progenitorii restricţionaţi există diferenţe importante, ceea ce converge cu eficienţa mai bună a neurotransplanturilor de celule suşe multipotente.

Un val de studii recente par să confirme această concluzie. E.Y. Snyder şi colaboratorii (1997) au demonstrat că celule suşe multipotente transplantate în creierul şoarecilor adulţi pot migra în locul unde celulele au suferit apoptoza şi le pot reface proiecţiile. Cercetătorii au indus apoptoza focală a neuronilor piramidali din straturile II/III ale izocortexului printr-o metodă fotolitică**3**. Să notăm, deocamdată că apoptoza reprezintă un program activ, protein-dependent, care determină moartea celulară (vezi: mai jos). Celulele suşe au fost injectate după două săptămâni în zona în stratul II/III din izocortex şi s-a observat că aceste celule se diferenţiază foarte prompt în neuroni, migrează spre locul unde neuronii au degenerat şi îi înlocuiesc, refăcând exact proiecţiile acestora (Fig. 3.16 A). Axonii acestor neuroni a fost chiar mielinizat. Cum au „ştiut" celulele suşe unde este nevoie de ele? Se ştie că interneuronii din proximitatea neuronilor care suferă. apoptoza lansează un semnal molecular care poate atrage eventuali progenitori; aceşti interneuroni

încep să secrete factori neurotrofici cum ar fi factorul de creştere derivat cerebral (BNDI, *brainderived neurotrophic factor)* sau neurotrofmele NT-3 şi NT-4/5. Este posibil ca aceşti factori să ghideze migrarea

Metoda constă din inducerea apoptozei focale prin leziuni fotolitice. Astfel, la nivelul terminalelor presinaptice ale neuronilor corticotalamici a fost injectată o substanţă de contrast (cromofor) care devine toxică atunci când este iradiată cu lumină roşie de la o sursă laser.

170

precursorilor şi chiar să asigure supravieţuirea lor în locaţia ţintă (Snyder & colab., 1997).

a b IIU e:

Fig. 3.16 A: *Vedere electronmicroscopică a unui neuron diferenţiat din celulele suşe injectate intraventricular la şoarecii la care a fost indusă apoptoza neuronilor piramidali din straturile corticale II/III. Neuronul prezintă caracteristici specifice pentru neuronii piramidali corticali: nudei mari (Nu), nucleoli proeminenţi (n), reticul. endoplasmatic bogat (EI), mitocondrii (m) şi dendrite apicole (d, evidenţiate-prin capete de săgeată), p indică markerul (X-Gal) prin care este confirmată originea clonală a neuronului, din celulele suşe injectate. Pătratul marcat cu „e" indică o altă imagine, care nu este prezentată.* Bară la scală: 1 um (Adaptat după Snyder & colab., 1997, cu permisiunea autorilor) B, C: *Oligodendrocitele provenite din celulele suşe transplantate la şoarecele şi sunt funcţionale. (B) La 6 săptămâni după transplant, se obsen a straturi mature de mielină compactă (săgeţi albe) în jurul axonilor; în detalii, se observă straturile concentrice de mielină. (C) Un axon slab mielinizat, tipic pentru creierul şoarecilor şi; săgeata invită la a compara straturile de mielină din B cu cele din A.* (Adaptat după Yandava, Billinghurst & Snyder, 1999, cu permisiunea autorilor)

Transplantarea celulelor suşe permite *şi* recuperarea comportamentală. O probă convingătoare este oferită tot de experimentele lui Snyder. Echipa acestuia a folosit şoareci la care olidodendrocitele nu pot efectua mielinizarea în sistemul nervos central datorită mutaţiei autozomal recesive a genei care codează proteina de bază a mielinei (MBP, *myelin basic protein).* Şoarecii cu acest fenotip se pânesc *şi,* de la *shiverer* (engl. care tremură), pentru că

din a doua săptămână de viaţă, indivizii încep să prezinte un tremor accentuat. Dacă însă li se injectează intraventricular, la naştere, o suspensie de celule suşe acestea migrează extensiv din zona subventriculară în diferite zone ale creierului, se diferenţiază în oligodendrocite şi încep să mi-elinizeze axonii neuronilor, astfel că, în circa 6 săptămâni, aproape jumătate din neuronii din sistemul nervos central sunt I inielinizaţi corect. În consecinţă, tremorul dispare după această perioadă, iar jfenotipul *şi* este astfel recuperat semnificativ (Fig. 3.16 B, C; Yandava, I Billinghurst & Snyder, 1999). Aceste rezultate indică potenţialul celulelor suşe pentru înlocuirea celulară globală care ar putea contribui, de pildă, la remielinizarea axonilor din SNC în boli cum ar fi scleroza multiplă (vezi şi: Keirstead & colab., 1999).

Un alt exemplu este oferit de şobolanii cu microcefalie. O singură injecţie a unui agent antimitotic, acetat metilazoximetanol (M-AM), la femelele de şobolani

gestante duce la reducerea semnificativă a volumului celular ai izocortexului şi hipocampului tuturor progeniturilor, defecte de morfogeneză asociate cu deficite severe ale puilor la sarcini de învăţare spaţială (Johnston & Coyle, 1979; Lee & Rabe, 1992). Transplantarea unor porţiuni integrale, de circa 10 mm^3, de ţesut izocortical prelevat de la un fetus în ziua E 18, a corelat cu reducerea microcefaliei şi a deficitelor de discriminare vizuală şi de învăţare spaţială (Lee & Rabe, 1998). E foarte probabil ca grefa să fi conţinut precursori neuronali capabili să participe la corticogeneză. Concluzia autorilor este că transplaturile de ţesut cerebral fetal şi, aşa cum am văzut, mai ales cele care conţin celule suşe neuronale, ar fi capabile de a atenua deficitele cognitive ce au rezultat din leziuni sau defecte cerebrale prenatale (Lee & Rabe, 1998).

Terapia celulară a fost cel mai intensiv investigată în cazul bolii Parkinson, respectiv, a modelelor experimentale ale acestei tulburări, e vorba de modelele de: leziuni prin 6-hidroxidopamină (6-OHDA) şi MPTP (l-metil-4-fenil-l, 2, 3, 6-tetrahidropiridină) (pentru o sinteză, vezi: Pinel, 1990, pp. 136 – 137). Deşi, aşa cum notam mai sus, primele transplanturi de ţesut nervos fetal nu au avut efecte foarte încurajatoare, lucrurile par să se schimbe odată cu posibilitatea de a controla conţinutul grefei prin metode de cultură a celulelor suşe

embrionare care că crească şansele de supravieţuire ale acestora (vezi, de ex.: Clarkson & colab., 1998), Şobolani la care depleţia neuronilor dopaminergici mezencefalici a fost efectuată prin administrarea de 6-OHDA au primit injecţii cu suspensii de celule suşe embrionare în striatum. Aceste celule s-au diferenţiat în neuroni dopaminergici specifici pentru mezencefalul ventral, au corectat tulburările hemodinamice de la nivelul striatumului cauzate în boala Parkinson de deprivarea striatumului de aferentele dopaminergice ale substanţei negre şi au corelat cu recuperarea asimetriei motorii (Bjorklund & colab., 2002). Ca să evităm concluzii prea entuziaste, citām chiar autorii acestui remarcabil studiu: „Dat fiind izolarea recentă cu succes a liniilor de celule suşe embrionare umane [vezi: J.A. Thomson & colab., 1998, *Science* 282, 1145 – 1147], descoperirile noastre asupra transplantării, extinderii şi diferenţierii eficiente de celule suşe embrionare în neuroni dopaminergici funcţionali în creierul adult au implicaţii pentru considerarea celulelor suşe embrionare ca o sursă donor pentru terapia celulară în boala Parkinson" (Bjorklund" & colab., 2002, pp. 2349). Dar, până la a fi aclamate, aceste aplicaţii trebuie să se asocieze cu studii care să ne elucideze de ce degenerează neuronii în boala Parkinson sau în celelalte tulburări neurodegenerative.

Încheiem aici excursia noastră prin sistemul nervos central adult. Am învăţat că neurogeneza este un proces care continuă şi după naştere, pe tot parcursul vieţii şi că aceasta ar putea avea implicaţii pentru comportament. Am împăcat apoi două seturi de date, unul care arăta că neuronii nu se pot divide şi celălalt care susţinea că există activitate mitorică în creierul postnatai, oferind perspectiva unei reconsiderări a stabilităţii celulare absolute a creierului adult Soluţia care a intermediat această conciliere este oferită de demonstrarea existenţei celulelor suşe neuronale. De la aceste cercetări până la ispita de a prezenta rezultate provocatoare despre neurotransplant şi terapia celulară nu a fost mult în fond.

172

acest capitol oferă oportunitatea de a concepe creierul ca pe un organ plastic, în care dezvoltarea nu se termină neonatal abrupt, continuându-se cu specializarea funcţională, ci continuă pe tot parcursul vieţii. Atât timp cât creierul este un organ viu, dezvoltarea sa continuă pentru că dezvoltarea înseamnă interacţiunea dintre

mecanismele de creştere neuronale şi constrângerile activităţii neuronale. Şi cum altfel decât plastic ar putea fi un organ care susţine un mecanism de învăţare adaptativ, care trebuie să răspundă unui mediu nostaţionar? Neuroştiinţele nu-şi vor putea fi niciodată suficiente pentru că ele spun povestea unui creier comportamental, nu a unui organ dintr-un borcan cu formol încuiat în biroul neuroanatomistului. În fine, pentru ca povestea dezvoltării să facă un tur complet, vom aborda în continuare ceea ce numim:

3.4 Regulile vieţii şi ale morţii: senescenţa şi moartea celulară

Orice organism multicelular are mecanisme prin care îşi poate distruge propriile celule, acest fenomen fiind fiziologic, participând la dezvoltare, la homeostazie şi la îmbătrânire. Acest fenomen prin care un organism îşi distruge propriile celule se numeşte apoptoză. E evident de ce niciun organism unicelular şi nu are mecanisme apoptotice care să poată fi considerate pur şi simplu I „fiziologice": dacă organismul ar declanşa apoptoză, ar însemna să se sinucidă, distrugându-şi singura celulă. Şi, oricât de simplistă ar părea, legea celulelor pare I să fie transmiterea genomului la celulele-fiice. La organisme unicelulare, apoptoză I poate fi însă un mecanism defensiv, astfel că, dacă, de pildă, unele bacterii I detectează un bacteriofag, acestea se sinucid pentru a preveni răspândirea infecţiei I la întreaga colonie. Apoptoză presupune un mecanism activ de sinucidere celulară, care pare să fie legat de evoluţia organismelor multicelulare şi de segregarea elulelor în celule somatice şi sexuale. Totodată, apoptoză se pare că a apărut atunci când celulele au învăţat să îmbătrânească după un număr de cicluri celulare, ilustrat până şi de celulele de drojdie care mor după un anumit număr de diviziuni asimetrice (Kennedy & colab., 1995).

Apoptoză este un proces de moarte celulară fiziologică declanşat de stimuli interni sau externi. Aceasta poate fi împărţită în patru faze. În prima fază, celula ecepţionează stimulul care declanşează apoptoză, acesta putând fi un semna! etern preluat de celulă prin receptori sau un semnal intern, generat de celulă în na acţiunii unui medicament, toxină sau prin expunere la radiaţii. A doua fază esupune transducţia acestui semnal la mecanismele subcelulare care controlează optoza. Urmează faza efectoare care pune în acţiune aceste mecanisme, anume mele proteaze şi moleculele lor reglatoare

(vezi: mai jos). Ultima fază, „postmortem", reprezintă degenerarea materialului nuclear al celulei, de la condensarea ornaţinei şi până la distrugerea ADN-ului (Fig. 3.17; vezi: Vaux & Strasser, 1996). Modelul experimental de elecţie, la care au fost descrise aceste etape ale optozei, este un vierme nematod, *Caenorhabditis elegans.* La acest model perimental au fost investigate genele responsabile de apoptoză, e vorba de genele / (engl.: *cell death abnormal,* moarte celulară anormală).

173

V

".

A

ar... *

Fig. 3.17 *Moartea neuronală ilustrată în hipocampul şobolanilor cu encefalopatie aluminică. A, neuroni cu un aspect normal (capete de săgeată) şi un număr semnificativ de neuroni degenerativi (săgeţi) în câmpul CA2 din hipocamp. B, neuron apoptotic.* Scala de mărime: A, B, x 400. (A: modificat după Miu & colab., 2002; B: A.C. Miu, C.E. Andreescu, R. Vasiu, A.I. Olteanu, observaţii nepublicate)

Ce legătură are apoptoza cu dezvoltarea sistemului nervos? O justificare interesantă este că, dacă neuronii maturi sunt printre celulele cele mai longevive, fapt corelat cu relativa stabilitate celulară postnatală a creierului, neuronii care sunt generaţi în timpul morfogenezei sistemului nervos sunt printre celulele care mor în numărul cel mai mare. Balanţa dintre mitoză, diferenţiere şi apoptoza determină numărul de celule din sistemul nervos în perioada perinatală. Deşi apoptoza se produce de circa 20 de ori mai rapid decât mitoza, în organism (pentru sistemul nervos, vezi: mai jos), această balanţă echivalează cele – 20%, reprezentând celule mitotice, cu – 1% celule apoptotice. La *C. elegans,* de exemplu, 131 de celule din cele 1090 care se formează mor în timpul dezvoltării. (Ellis & Horvitz, 1986)

Organizarea citoarhitecturilor nervoase presupune selecţii marcate de fiecare din procesele morfogenezei: mitoza (celule care ies din ciclul de diviziune pot suferi apoptoza – în zona ventriculară), migrarea neuronală (unii neuroblaşti suferă apoptoza în timp ce

parcurg zona intermediară, de pildă), apoi, agregarea în stratul cortical ţintă, poate locul în care apoptoza reduce cel mai mult numărul de neuroni. Această etapă a dezvoltării, marcată de apoptoza, trebuie concepută ca o operaţie de scădere, prin care celulele care sunt produse, au migrat sau s-au agregat sunt scăzute din cele care sunt necesare din punct de vedere funcţional. Acest stadiu nu trebuie nicidecum considerat ca un eveniment regresiv din punct de vedere morfo-funcţional.

Apoptoza poate să fie foarte extinsă, afectând majoritatea celulelor care au fost produse iniţial. Astfel, retina începe să stabilească conexiuni cu structuri nervoase subcorticale cum ar fi coliculii superiori sau nucleii geniculaţi laterali în a treia lună după fecundaţie. După aproximativ o lună, tracturile optice ating numărul maxim de fibre nervoase pentru ca, până în luna a cincea după fecundaţie, mai mult de 80% din aceste fibre să fie eliminate prin apoptoza! (Provis & Penfold, 1988)

174

Astfel de procese apototice se întâmplă şi în izpeortex, mai ales în subplacă (prenatal) şi în straturile superficiale (şi postnatal, în primele două luni) (Shatz, Chun & Luskin, 1988; Woo, Beale & Finlay, 1991; O'Kusky & Collonier, 1982; Finlay & Slattery, 1983). Apotoza corelează cu perioada în care sunt stabilite principalele conexiuni nervoase, astfel că ea ar putea stabili o ordine, putându-se realiza sinapse între un număr limitat de neuroni specifici dintr-o citoarhitectură, şi chiar o simetrie, astfel încât conexiunile interemisferice să lege citoarhitecturi similare (pentru o discuţie, vezi: Finlay, 1992). Sigur, aceste conexiuni sunt modelate în chip major după naştere, prin regulile pe care le va dicta activitatea neuronală. Dar apoptoza prenatală pare să sculpteze citoarhitecturi le corticale respectând anumite constrângeri topografice. Ne-am putea întreba de ce mecanismul genetic care controlează neurogeneza permite producerea mai multor 'neuroni decât este necesar pentru stabilirea unei citoarhitecturi tipice? Sigur, o explicaţie antropomorfică ar susţine că sistemul nervos este „precaut". O formulare mai plauzibilă ar fi că populaţii supranumeroase de neuroni, care sunt inervaţi de proiecţii divergente, e mai probabil să fie, în final, normal inervate şi să achiziţioneze funcţia tipică (Nowakowski, 1996).

Studii recente au indicat că, în creierul uman în dezvoltare,

apoptoza înregistrează nivelurile maxime în subplacă şi în stratul I (vezi: Rakic & Zecevic.

2000). S-a arătat că precursorii neuronali sunt cei care suferă apoptoza în primul trimestru de gestaţie, iar celulele gliale, generate după neuroni, au un index apoptotic mai mare după jumătatea perioadei gestaţionale. Aceste cercetări indică

I existenţa a două tipuri de apoptoza la nivelul telencefalului uman: apoptoza

I embrionară, care este sincronă cu proliferarea şi migrarea neuronilor şi care.

I probabil, are funcţii independente de stabilirea circuitelor nervoase şi apoptoza

I fetală, care coincide cu diferenţierea celulelor nervoase şi cu sinaptogeneza şi care

ar putea fi, deci, legată de formarea circuitelor nervoase (Rakic & Zecevic, 2000).

Cum mor neuronii? Ca orice altă celulă, neuronii au nevoie de suport trofic. V. Hamburger şi R. Levi-Montalcini au descris într-o lucrare de pionierat că 1 supravieţuirea neuronilor imaturi este dependentă de disponibilitatea ţintei pe care trebuie să o inerveze (Hamburger & Levi-Montalcini, 1949). Aceste cercetări au condus la ipoteza neurotrofinelor care consideră că neuronii concurează pentru resurse trofice limitate care sunt oferite de celula postsinaptică (Purves, 1 – 988). Este **Iun** fapt recunoscut astăzi că neurotrofinele sunt semnale difuzibile, sintetizate mai ales la nivelul celulei postsinaptice, care modulează dezvoltarea proceselor neuronale, funcţionarea canalelor ionice şi eficacitatea sinaptică (pentru o sinteză, «vezi: Fitzsimonds & Poo, 1998) Deci, conform acestei ipoteze, numai neuronii care reuşesc să facă sinapse vor supravieţui, având acces la suportul trofic. Ceea ce nu Iau indicat aceste cercetări clasice este mecanismul prin care neuronii care nu pot Iface sinapsă cu ţinta mor.

Apoptoza are o istorie lungă. În 1842, C. Vogt indica faptul că o parte din celule mor în timpul dezvoltării şi considera, deci, că acest tip de moarte celulară

Iste fiziologic. Descrieri ale. transformărilor morfologice ale celulei care suferă îioarte celulară au arătat că tipice sunt condensarea materialului citoplasmic şi a

cromatinei nucleare şi Uzarea celulei (Glücksman, 1951; Tata, 1966; pentru o sinteză, vezi: Clarke & Clarke, 1996). J.R. Tata demonstrase că aceste transformări pot fi prevenite prin administrarea unui inhibitor al sintezei de proteine (Tata, 1966). Termenul vehiculat iniţial a fost cel de moarte celulară programată, folosit pentru a descrie moartea celulară în dezvoltarea muşchilor şi a altor sisteme la viermele de mătase. Un alt termen, mai sugestiv, era necroza de micşorare, însă „apoptoză" este termenul care este consacrat din anii '70 (Kerr, 1965). Aceste denumiri au coexistat însă până recent, moartea celulară programată şi apotoza fiind folosite pentru a desemna acelaşi proces la nevertebrate, respectiv, la mamifere. În acelaşi timp, primul denota modificări morfologice, iar al doilea are mai ales denotaţii biochimice.

E. M. Johnson Jr. şi colaboratorii sunt cei care au demonstrat că apoptoză la neuroni este un mecanism activ, care necesită sinteza de proteine. Aceştia au observat» că inhibarea sintezei de AM şi proteine blochează moartea celulară a neuronilor simpatici deprivaţi de factorul de creştere neuronal (NGF). Aceasta este prima dovadă că neuronii nu mor pasiv, ci se sinucid prin declanşarea unui program celular specific. Apoptoză este diferită de alte tipuri de moarte celulară cum ar fi necroza, moartea celulară toxică, care se asociază cu evenimente inflamatorii şi ţesut cicatricial, în timp ce apoptoză presupune fagocitarea rapidă a celulei fără efecte inflamatorii pentru ţesutul din jur. Ulterior, au fost identificate la *C. elegans* genele responsabile de apoptoză, numite gene *ced (ced-3, ced-A, ced-9)* (pentru o sinteză, vezi: Metzstein, Stanfield & Horvitz, 1998). Cercetările echipei lui H.R. Horvitz**4** au indicat funcţia moleculară a produselor acestor gene: *ced-9* blochează apoptoză (să îl numim genă „bună"), *ced-3* execută apoptoză (genă „rea"), iar *ced-A* este activator al apoptozei (genă „urâtă") (Melino, 2002). La mamifere, în apoptoză declanşată de deprivarea de NGF participă enzime numite cistein proteaze sau caspaze, codate de oftoloagele la mamifere ale genei *ced-3*. La om, grupele de gene îşi păstrează funcţia moleculară: există peste 21 de „buni" (familia *Bel-2),* 14 „răi" (familia caspazelor) şi un „urât" *(Apar-l, apoptoticl protease-activating factor 1)*. În funcţie de fenotip şi de perioada de dezvoltare, neuronii exprimă combinaţii diferite de factori *Bel-2* şi caspaze.

Familia *Bel-2* nu cuprinde numai „buni", adică factori care

blochează apoptoză, ci şi factori proapoptotici, dar rolul generic al acestora este în transducţia semnalului apoptotic. Majoritatea factorilor antiapoptotici sunt localizaţi pe membrana externă a mitocondriilor, pe reticulul endoplasmatic şi pe membrana perinucleară. Supraexprimarea *Bel-2* poate împiedica transducţia semnalului apoptotic declanşat de deprivarea neuronilor simpatici de NGF. Deci, acest factor ar putea avea un rol protector atât împotriva deprivării de factori trofici, cât şi împotriva unor stimuli patologici. Aşa s-ar putea explica de ce *Bel-2* este exprimat în perioada embrionară şi fetală şi expresia sa scade după naştere.

4 H. Robert Horvitz este unul din cei cărora le-a fost acordat premiul Nobel pentru Fiziologie şi Medicină în 2002, pentru cercetări privind mecanismele moleculare ale morţii celulare.

* „176

k

Foarte interesant, în relaţie cu diferenţa pe care o discutam mai sus dintre SNC şi SNP, expresia *Bel-2* se păstrează pe tot parcursul vieţii în SNP. La homozigoţii Be/-2-deficienţi, imediat după naştere, se poate constata pierderea unui număr de neuroni motori, senzitivi şi simpatici, ceea ce indică rolul esenţial al acestui factor în supravieţuirea neuronală. (Veis & colab., 1993). Un rol mai specific pare să îl aibă factorul *Bel-xL,* a cărui expresie se păstrează pe tot parcursul vieţii în SNC, şi care este asociat cu supravieţuirea neuronilor imaturi, înainte ca aceştia să stabilească sinapse. Homozigoţii *Bel-xL f* mor timpuriu în viaţa embrionară, neviabilitatea derivând şi din moartea neuronală masivă în sistemul nervos (Gonzalez-Garcia & colab., 1995). Aceşti doi factori *(Bel-2* şi *Bel-x. L—)* protejează celulele de moarte neuronală prin reprimarea proteinelor proapototice din familia „bunilor", cum ar fi BAX. La homozigoţii *Bax",* ganglionul cervical superior şi nucleul facial conţin semnificativ mai multe celule decât la şoarecii normali, iar aceste celule sunt mai rezistente la deprivarea de NGF (pentru o sinteză, vezi: Merry & Korsmeyer, 1997).

Apar-l este proteina care activează apoptoza, transducând semnalul apoptotic declanşat de lezarea mitocondriilor şi activând caspazele. Apar-l este indispensabilă pentru dezvoltarea normală a sistemului nervos pentru că s-a arătat că homozigoţii *Apar-Y1* mor în viaţa embrionară timpurie, prezentând o zonă ventriculară

suprapopulată (Cecconi & colab., 1998). Principalele caspaze care controlează apoptoza neuronală sunt caspaza-9 care activează caspaza-3. Mai specific, caspaza-9 formează un complex molecular cu Apar-l şi cu citocromul e eliberat de mitocondrii, acest complex având rolul de a activa procaspaza-9. Atunci când este activat, procaspaza-9 îşi schimbă configuraţia şi activează caspaza-3, care se asociază cu fragmentarea ADN-ului şi, în final, Uzarea şi fagocitarea celulei. Şoarecii deficienţi pentru caspaza-3 sau caspaza-9 prezintă mase celulare ectopice în izocortex, în hipocamp şi striatum, precum şi o zonă ventriculară suprapopulată, ca în cazul *Apar-Y1* (Kuida & colab, 1996, 1998), Familia caspazelor e probabil să ofere încă multe descoperiri, ea cuprinzând 14 factori care se consideră că sunt organizaţi în căi de semnalizare paralele care ar putea răspunde la stimuli diferiţi (deprivare de factori trofici, leziune ischemică ş.a.). Mai mult, există dovezi preliminare că unele caspaze sunt activate şi declanşează apoptoza numai în condiţii patologice, cum ar fi în cazul tulburărilor neurodegenerative ca Alzheimer, Parkinson, Huntington sau demenţa frontotemporală. Odată cu avansarea acestor cercetări, ar fi posibilă inhibarea apoptozei patologice fără perturbarea dezvoltării şi homeostaziei sistemului nervos (pentru. O sinteză, vezi: Ameisen, 1999).

Apoptoza este sculptorul materiei vii. Aşa cum ne dăm seama, dezvoltarea sistemului nervos este o sumă algebrică de evenimente de creştere (de ex., neurogeneza) şi reducere (apoptoza). Dezvoltarea se prelungeşte şi în perioada adultă. Dar ce se întâmplă după aceea? Dacă din viaţa embrionară şi pe parcursul a ceea ce numim stare adultă, creierul se adaptează pentru comportament, putem spune că senescenţa inversează jocul, comportamentul adaptându-se la modificările din creier. Vom aborda în continuare câteva din teoriile cele mai importante care

Încearcă să explice de ce îmbătrânim. Înainte de toate, să ne dăm seama că îmbătrânim fiziologic pentru că suntem o colecţie de celule cu un ciclu de viaţă limitat. îmbătrânirea este, deci, o problemă importantă a biologiei celulare. Ce determină senescenţa celulelor? Deocamdată avem teorii şi cam un gram de date experimentale.

3.4.1 Senescenţa celulară

Viaţa majorităţii celulelor se măsoară în diviziuni. Atunci când o

celulă îşi scade numărul de diviziuni şi iese din ciclul celular, starea în care intră se numeşte senescenţa replicativă. Perioada în care celula înregistrează un declin proliferativ semnificativ se numeşte criză. În cazul neuronilor, celule care nu se divid, viaţa înseamnă perioada în care celula este funcţională după ce iese din ciclul celular. Deci, o operaţionalizare completă a vieţii celulare trebuie să cuprindă numărul de diviziuni şi durata etapei Go. după ce celulă a ieşit din mitoză. La baza teoriilor despre senescenţa replicativă stau trei observaţii clasice făcute la celule din culturi. Prima astfel de observaţie a indicat că există o corelaţie între cât mai poate trăi o celulă *in vitro,* fără factori exogeni care să îi modifice programul celular, şi vârsta organismului de la care a fost prelevată. Apoi, există o corelaţie între durata vieţii unei celule şi durata medie de viaţă specifică indivizilor unei specii. S-a mai observat că celulele prelevate de la indivizi afectaţi de îmbătrânire timpurie, ca în cazul unor pacienţi cu boala Alzheimer cu debut timpuriu, au o durată de viaţă *in vitro* semnificativ redusă. Explicaţiile oferite pentru aceste observaţii au considerat fie posibilitatea acumulării unor mutaţii, fie existenţa unui ceas celular care monitorizează diviziunile şi, probabil, durata fazei Go. Cea de-a doua ipoteză este mai bine probată experimental.

Senescenţa celulară este un caracter genetic dominant. Acest fapt a fost indicat de experimente în care ARN-ul mesager (ARNM) de la celule senescente a fost injectat la celule presenescente, efectul fiind stoparea creşterii acestora din urmă (Lumpkin & colab., 1986).

Ipoteza ceasului celular se leagă de cea mai populară teorie a senescenţei replicative. Această teorie pune la baza senescenţei celulare scurtarea cu fiecare mitoză a telomerelor, structuri nucleoproteice care se găsesc în vârful braţelor scurte ale cromozomilor. Celulele germinative primordiale, precursorii celulelor sexuale, şi celulele suşe neuronale, de pildă, prezintă o activitate crescută a telomerazei, o enzimă despre care se ştie că permite păstrarea lungimii telomerelor. Cu fiecare diviziune, se estimează că telomerele celulelor se scurtează cu circa 50 – 100 bp**5**. Această estimare este în acord cu cercetările care au arătat că, la o celulă tânără, telomerele au – 18 – 25 kbp, iar, la celulele senescente, acestea au – 8 – 10 kbp (Counter & colab., 1992). Celulele în stare de criză au telomere de 1 până la 3 – 4

Mărimea moleculei de ADN se măsoară în numărul de baze

perechi (bp) sau baze complementare de pe dublul helix, formate după regulile de asociere ale adeninei (a) cu timina (T) şi ale citozinei (C) cu guanina (G). 1.000 bp = 1 kbp; 1.000 kbp = 1 Mbp.

178

1

kbp. Telomerele nu se scurtează numai atunci când celula se divide, ci şi în situaţiile când viaţa celulei în stare de criză, aflată în cultură, este prelungită prin factori exogeni (Brown, Wei & Sedivy, 1997). Scurtarea telomerelor s-ar putea să dea un semnal care să semnifice alterarea ADN-ului şi să conducă la intrarea în senescenţă a celulei pentru a preveni menţinerea unei celule instabile genetic.

Scurtarea telomerelor în timpul mitozei are drept cauză replicarea incompletă a secvenţelor terminale de ADN cu ajutorul polimerazelor. Lungimea telomerelor este, totuşi, menţinută, prin activitatea unei enzime numită telomerază care catalizează sinteza *de novo* a ADN-ului telomeric. Această enzimă este absentă în celulele somatice supuse senescenţei, dar este prezentă în niveluri variabile în celulele suşe, în celulele germinative primordiale şi în celulele neoplastice. La început, s-a crezut că telomerază este singurul mecanism prin care se poate menţine lungimea telomerelor în celulele care suferă mitoză şi s-a ajuns la ipoteza că prezenţa telomerazei şi menţinerea lungimii telomerelor este necesară pentru menţinerea nelimitată a proliferării celulare şi tumorigeneză (Bacchetti & Counter, 1995). Studii mai recente au arătat însă că există şi alte mecanisme de menţinere a lungimii telomerelor, independente de telomerază, unul din aceste mecanisme bazându-se pe recombinarea telomerelor şi fiind numit mecanism alternativ de alungire a telomerelor (ALT, *alternative lenghtening of telomeres).* Cele două mecanisme pot coexista în aceeaşi celulă (pentru detalii, vezi: Cerone, Londono-Vallejo & Bacchetti, 2001; Stewart & colab., 2002).

Teoria pare să fie contrazisă de studii relativ recente care arată că celule de la specii de şoareci cu teiomere de lungimi semnificativ diferite au aproximativ aceeaşi durată de viaţă în cultură, fapt care contrazice predicţia modelului, după care cu cât sunt mai lungi telomerele, cu atât durata de viaţă a celulei trebuie să fie mai mare (Broccoli & colab., 1996). Oricum, ceea ce rezultă din toate aceste cercetări este un rol al scurtării telomerelor în ceasul celular care monitorizează vârsta celulei. Din această perspectivă, J.M. Sedivy

notează că:

„Prefer să folosesc [termenul] „senescenţă" într-un sens mai restrâns, cu trimitere la mecanisme, pentru a desemna răspunsul declanşat în celule normale. Consider că senescenţă celulară este un proces activ, programat genetic, care răspunde la un semnal inductor: în acest caz, poate, scurtarea telomerelor". (Sedivy, 1998, pp. 9079)

3.5 Rezumat

Cortexul cerebral a fost investit mult timp atât de neuroanatomişti, cât şi de specialiştii în neurobiologia evoluţionistă cu titlul de cel mai bun proiect al evoluţiei creierului. Studii de neurobiologie celulară mai recente arată însă ca expansiunea cortexului cerebral poate fi justificată prin diferenţa dintre rata de proliferare şi durata mitozei celulelor neuroepiteliale care dau naştere la ultimele valuri de neuroni care populează straturile corticale. Cercetări clasice au indicat structura peretelui neuroepitelial format din celule care comunică prin joncţiuni strânse şi au descris comportamentul mitotic al acestor celule. Migrarea

Interkinetică este traseul stereotip pe care îl adoptă celula neuroepitelială aflată în diferite faze ale mitozei.

Majoritatea celulelor care populează cortexul cerebral provin din progenitorii aflaţi în zona ventriculară din regiunea dorsală a telencefalului. Primul strat care se formează se numeşte preplacă, acest strat plexiform fiind traversat şi împărţit de neuroni din primele valuri de neurogeneză în subplacă şi strat marginal. Între aceste două straturi se formează placa corticală, din care vor lua naştere straturile II-VI ale cortexului cerebral matur. Rolul celulelor Cajal-Retzius în decuplarea neuroblaştilor de pe substratul de migrare poate oferi perspectiva explicării secvenţelor diferite după care sunt generaţi neuronii în cortexul cerebral al mamiferelor faţă de cel al reptilelor.

Modul predominant de migrare neuronală este migrarea radială, cu ajutorul celulelor gliale radiale, care sunt generate înainte de primele valuri de neurogeneză. Acest mod de migrare favorizează perspectiva după care cortexul. cerebral se dezvoltă respectând unităţi radiale, în care localizarea unei celule în plan radial şi orizontal este determinată de localizarea precursorului în zona ventriculară, respectiv, momentul ieşirii progenitorului din ciclul celular. Acest model al dezvoltării şi evoluţiei cortexului cerebral, numit modelul

unităţii Iradiate, a fost provocat de cercetări recente care arată că între neuroni din unităţi radiale diferite există relaţii clonale şi că neuronii din cortexul cerebral pot migra şi tangenţial. Alt mod de migrare a acestor neuroni este translocarea somală.

Rolul factorilor intrinseci, adică unele gene care sunt exprimate regional în cortexul cerebral înainte de sosirea aferentelor, şi a unor factori extrinseci, cum ar fi inputurile aduse de proiecţiile talamocorticale, în stabilirea hărţii funcţionale a cortexului cerebral este una din temele „fierbinţi" din neuroştinţele dezvoltării, astăzi. Experimente în care inputuri dintr-o anumită modalitate senzorială au fost redirecţionate, fără a afecta integritatea proiecţiilor talamocorticale, spre ţinte corticale specifice altor modalităţi senzoriale au arătat că ariile corticale dispun de un mare potenţial plastic şi că organizarea funcţională a acestora se bazează pe rolul crucial al aferentelor.

Creierul adult continuă să producă noi neuroni. Dincolo de faptul că aceste descoperiri provoacă o dogmă despre capacitatea plastică a creierului adult, ele ne pot oferi o lecţie despre neurogeneză în general. Oferim o incursiune în cercetările care investighează proprietăţile celulelor suşe neuronale, potenţialul lor terapeutic în terapia celulară şi contribuţia pe care descrierea acestor populaţii de celule pluripotente care persistă în creierul adult a avut-o la dezvoltarea biotehnologiei. În final, abordăm problema senescenţei celulare şi a apoptozei, de la experimentele clasice care au sugerat ipoteza neurotrofică până la teoria scurtării telomerelor. Acest capitol urmăreşte viaţa neuronului, de la ieşirea din ciclul celular până la moartea celulară.

180

REFERINŢE BIBLIOGRAFICE:

— Referinţe recomandate Referinţe de mare interes

Aboitiz, F… Morales, D., Montiel, J. (2001) *The inverted neurogenetic gradient of the mammalian isocortex: development and evolution.* Brain Res. Rev. 38.

129 – 139 Adrian Jr., E.K., Walker, B.E. (1962). *Încorporation of thymidine-H3 by cells în normal and înjured mouse spinal cord.* J. Neuropathol. Exp. Neurol. 21.

597 – 609 Alexiades, M.R., Cepko, C.L. (1996) *Quantitative analysis of proliferation and cell cycle length during development of the*

rat retina. Dev. Dyn. 205, 293

307 Allen, E. (1912). *Cessation of mitosis in the central nervous systern of the albino rat.* J. Comp. Neurol. 22, 547 – 568 Altman, J. (1962). *Are new neurons formând in the brains of adult mammals?*

Science 135, 1127 – 1129 Altman, J. (1963). *Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains ofrats andeats.* Anat. Rec. 145, 573 – 591 „Altman, J. (1969). *Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis: cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb.* J.

Comp. Neurol. 137, 433 – 458

Prezentarea unor dovezi extensive care susţin producerea de noi neuroni în creierul adult. Studiul indică faptul că neurogeneza continuă în bulbul olfactiv adult, dar, mai ales, că neuronii migrează şi spre cortexul cerebral. Altman, J. (1982). *Morphological development of the rat cerebellum and some of its mechanisms.* Exp. Brain. Res. [Suppl.] **6, 8 – 49** „Altman, J., Das, G.D. (1965 a). *Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis în rats.* J. Comp. Neurol. 124, 319

335

Primul studiu care demonstrează prezenţa neurogenezei în creierul şobolanilor adulţi. Altman, J., Das, G.D. (1965 b). *Postnatal neurogenesis in the gunea-pig.* Nature

214, 1098 – 1101 Altman, J., Bayer, S.A. (1990 a). *Mozaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinai sources of dentate granule cells.* **J. Comp. Neurol. 301, 325 – 342** Altman, J., Bayer, S.A. (1990 b). *Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods.* **J. Comp. Neurol. 301, 365 – 381**

181

Alvarez-Buylla, A., Theelen, M., Nottebohm, F. (1990) *Proliferation „hoţ spots". În adult avion ventricular zone reveal radial cell division.* Neuron 5, 101

109 Amarai, D.G., Price, J.L., Pitkănen, A., Carmichael, S. T. (1992) Anatomical

Organization of the Primate Amygdaloid Complex. În: Aggleton, J. P.

(Ed.): *The Amygdala. Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and*

Mental Dysfunction (pp. 1 – 66). Wiley-Liss, New York Ameisen, J.C. (1999) *La sculpture du vivant.* Editure du Seuil, Paris Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M.

A., Istkovitz-Eldor, J., Thomson, J.A. (2000). *Clonally derived human embryonic stern cell lines maintain pluripotency and proliferative potențial forprolongedperiods ofculture.* Dev. Biol. 227, 271 – 278 Angelucci, A., Clască, F., Sur, M. (1998) *Brainstem inputs to the fier ret mediali geniculate nucleus and the effect of early deafferentation on novei retinal profections to the auditory thalamus.* J. Comp. Neurol. 400, 417 – 439 Angevine, J.B., Sidman, R.L. (1961) *Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse.* Nature 192, 766 – 768 Arimatsu, Y., Miyamoto, M., Nihonmatsu, L., Hirata, K., Uratani, Y., Hatanaka.

Y., Takiguchi-Hayashi, K. (1992) *Early regional specification for a molecular neuronalphenotype in the rat neocortex.* Porc. Natl. Acad. Sci.

USA 89, 8879 – 8883 Arimatsu, Y., Nihonmatsu, L, Hirata, K., Takiguchi-Hayashi, K. (1994)

Congeneration of neurons with a unique molecular phenotype în layers V

and VI ofwidespread lateral neocortical areas in the rat. J. Neurosci. 14.

2020 – 2031 Bacchetti, S., Counter, C.M. (1995) *Telomeres and telomerase in human cancer.*

Int. J. Oncol. 7, 423 – 432 Bayer, S.A. Yackel, J.W., Puri, P.S. (1982). *Neurons in the rat dentate gyrust granular layer substantially increase during juvenile and adult life.* I

Science 216, 890 – 892 Benuskovă, L., Rema, V., Armstrong, J., Ebner, F.F. (2001) *Theory for normali and impaired experience-dependent plasticity în neocortex of adult ratsM*

Porc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 2797 – 2802 „Bernier, P.J., Bedard, A., Vinet, J., Levesque, M., Parent, A. (2002) *Newly generated neurons in the amygdala and adioining cortex of adult primates.*

Porc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 11464 – 11469

Cea mai recentă cercetare în care se confirmă neurogeneza în complexul amigdalian şi în cortexul piriform din creierul adult şi se

arată că există o cale migratorie numită rețea migratorie temporală, pe care acești neuroni migrează tangențial de la cornul temporal al ventriculilor laterali la locațiile precizate din lobul temporal. Berry, M., Rogers, A.W. (1965) *The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex.* J. Anat. 99, 691 – 709

182

Biebl, M, Cooper, C. M, Winkler, J., Kahn, H.G. (2000) *Analysis of neurogenesis andprogrammed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult ratbrain.* Neurosci. Lett. 291, 17 – 20 Bjorklund, A., Dunnett, S.B., Lewis, M.E., Iversen, S.D. (1980) *Reinnervation of the denervated striatum by substantia nigra transplants: Funcțional conséquences as revealed by pharmacological and senzorimotor testing.*

Brain Res. 199, 307 – 333 Bjorklund, A., Gage, F. (1985) Neural grafting în animal models of neurodegenerative diseases. În: Nottebohm, F. (Ed.): *Hope for a new neurology* (pp. 53 – 81). Ann. NY Acad. Sci, New York Bjorklund, A., Stenevi, U. (1979) *Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants.* Brain Res. 177, 555 – 560 „Bjorklund, L.M., Sánchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, I. Y.

C, St. P. McNaught, K., Brownell, A.-L., Jenkins, B.G., Wahlestedt, C.

Kim, K.-S., Isacson, O. (2002) *Embryonic stern cells develop into funcțional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 2344 – 2349

Unul din cele mai elegante studii care demonstrează că celulele suşe injectate în creierul cu o neurodegenerare specifică bolii Parkinson se diferențiază în neuroni care secretă dopamină şi compensează deficitele comportamentale. Björnsson, C.R., Rietze, R.L., Reynolds, B.A., Magii, M.C., Vescovi, A.L. (1999).

Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stern cells in vivo. Science 283, 543 Bray, G.M., Vidal-Sanz, M., Aguayo, A.J. (1987) Regeneration of axons from the central nervous sistem of adult rats. În: Seil, F.J., Herbert, E., Carlson, B.

M. (Eds.): *Progress în brain research* (voi. 71, pp. 373 – 378). Elsevier.

New York Brittis. P.A., Meiri, K., Dent, E., Silver, J. (1995) *The earliest patterns of neuronal differentiation and migration in the mammalian central nervous sistem.*

Exp. Neurol. 134, 1-12 Broccoli, D., Godley, L.A., Donehower, L.A., Varmus, H.E., de Lange, T. (1996)

Telomerase activation in mouse mammary tumors: lack of detectable telomere shortening and evidence for regulation of telomerase RNA with celiproliferation. Mol. Cel. Biol. 16, 3765 – 3772; Brodmann, K. (1909) *Vergleichende Lokalisationlehre de Grosshimrinde în Ihren*

Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues. Barth, Leipzig Broide, R.S., O'Connor, L.T., Smith, M.A., Smith, J.A.M., Leslie, F. M. (1995)

Developmental expression of a7 neuronal nicotinic receptor messenger

RNA în rat senzory cortex and thalamus. Neuroscience 67, 83 – 94 Brook, F.A., Gardner, R.L. (1997) *The origin and efficient derivation of embryonic stern cells in the mouse.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 5709

5712 Brown, J.P., Wei, W. Sedivy, J.M. (1997) *Bypass of senescence after disruption of **ze PIWA1"** gene în normal diploid human fibroblasts.* Science 277.

831 – 834

183

Brundin, P. Isacson, O., Bjorklund, A. (1985) *Monitoring of cell viability în suspensions of embryonic CNS tissue and its use as a criterion for intracerebral graft survival.* Brain Res. 331, 25 i-259 Cameron, H.A., Woolley, C.S., McEwen, B.S., Gould, E. (1993). *Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat.*

Neuroscience 56, 337 – 344 Cameron, H., McKay, R.D. (1999). *Restoring production of hippocampal neurons în old age.* Nat. Neurosci.2, 8 94 – 897 Castellani, V., Bolz, J. (1997) *Membrane-associated molecules regulate the formation oflayer-specific cortical circuits.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 94.

7030 – 7035 Cattaneo, E., McKay, R. (1990). *Proliferation and differentiation of neuronal stern cells regulated by nerve growth factor.* Nature 347, 762 – 765 Caviness, V.S., Rakic, P. (1978) *Mechanisms of cortical development: a view from mutations in mice.* Annu. Rev. Neurosci. 1, 297 – 326 Cecconi, F., Alvarez-Bolado, G., Meyer, B. L, Roth, K.A., Grüss, P. *(199%) Aparl*

(CED-4 homolog) regulates programmed cell death în mammalicm development. Cell 94, 727 – 737 Cerrone, M.A.,

Londono-Vallejo, J.A., Bacchetti, S. (2001) *Telomere maintenance by telomerase and by recombination can coexist in human cells.* Hum. Mol. Genet. 10, 1945 – 1952 Chanas-Sacre, G., Rogister, B., Moonen, G., Leprince, P. (2000) *Radia! glia phenotype: origin, regulation and transdifferentiation.* J. Neurosci. Res.

61, 357 – 363 Chauham, A.N., Lewis, P.D. (1979). *A quantitative study of cell proliferation in ependyma and choroid plexus in the postnatal rat brain.* Neuropathol.

Appl. Neurobiol. 5, 303 – 309 Cherubini, E., Gaiarsa, J.L., Ben-Ari, Y. (1991). *GABA: An excitatory transmitter in early postnatal Ufe.* Trends Neurosci. 14, 515 – 519 Chiasson, B.J., Tropepe, V., Morshead, C.M., van der Kooy, D. (1999) *Adult mammalian forebrain ependymal and subependymai cells demonstrate proliferative potenţial, but only subependymai cells have neural stern cell characteristics.* J. Neurosci. 19, 4462 – 4471 Chu, V.T., Gage, F.H. (2001) *Chipping away at stern cells.* Porc. Natl. Acad. Sci.

USA 98, 7652 – 7653 Clancy, B., Darlington, R.B., Finlay, B. L. (2000) *The course of human events:*

predicting the timing of primate neural development, Dev. Sci. 3, 1, 57 – 66 Clarke, P.G., Clarke, S. (1996) *Nineteenth century research on naturally occuring cell death and relatedphenomena.* Anat. Embryol. 193, 81 – 99 Clarkson, E.D., Zawada, W.M., Adams, F.S., Bell, K.P., Freed, C.R. (1998)

Strands of embryonic mesencephalic tissue show greater dopamine neuron survival and better behavioral improvement that cell suspensions after ***transplantation in parkinsonian rats.*** **Brain Res. 806, 60 – 68**

184

! II

Cohen-Tannoudji, M., Babinet, C, Wassef, M. (1994) *Early determination of a mouse somatosensory cortex marker.* Nature 368, 460 – 463 Comitetul Boulder (1970) *Embryonic vertebrate central nervous sistem: revised terminology.* Anat. Rec. 166, 257 – 262 Comitetul Nomenclaturii Eph (1997) *Unified nomenclature for Eph family receptors and the în Hgands. the ephrins.* Cell 90, 403 – 404 Counter, C. ML, Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C. W.

Harley, C.B., Bacchetti, S. (1992) *Telomere shortening associated*

with chromosome instability îs arrested în immortal cells wich express telomerase activity. EMBO J. 11, 1921 – 1929 Creutzfeld, O.D. (1977) *Generality of the funcţional structure of the neocortex.*

Naturwissenschaften 64, 507 – 517 Crowley, J. C, Katz, L.C. (2000) *Early development of ocular dominance columns.* Science 290, 1321 – 1324 Currari, T., D'Arcangelo, G. (1998) *Role of reelin in the control of brain development.* Brain Res. Rev. 26, 285 – 294 Das, G.D., Altman, J. (1971) *Transplanted precursors ofnerve cells: Theirfate in the cerebellums ofyoungrats.* Science 214, 931 – 933 Das, G.D., Hallas, B.H., Das, K.G. (1981) *Transplantation of brain tissue in the brain of rat: I. Growth characteristics of neocortical transplants from embryos of different ages.* Am. J. Anatom. 158, 135 – 145 David, S., Aguayo, A. J. (1981) *Axonal elongation intoperipheral nervous sistem*

„Bridges" after central nervous sistem înjury în rats. Science 214, 931

933 Davies, S.J.A., Fitch, M.T., Memberg, S. P" Hall, A.K., Raisman, G., Silver, j.

(1997) *Regeneration of adult axons în white matter tracts of the central nervous sistem.* Nature 390, 680 – 683 Davis, A.A., Temple, S. (1994). *A self-renewing multipotenţial stern cell în embryonic rat cerebral cortex.* Nature 372, 263 – 266 De Carlos, J.A., Lopez-Mascaraque, L., Valverde, F. (1999) *Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat.* J. Neurosci. 19.

6146 – 6156

Un studiu descriptiv, prin metoda autoradiografiei cu]H-timidină, al dinamicii migrării neuroblaştilor din eminenţa ganglionară laterală de la şobolan. Devor, M., Caviness, V.S., Jr., Derer, P. (1975) *A normally laminated afferent projection to an abnormally laminated cortex: Some olfactory connections in the reeler mouse.* J. Comp. Neurol. 164, 471 – 482 Doctsch, F., Alvarez-Buylla, A. (1996) *Network of tangenţial pathways for neuronal migration in adult mammalian brain.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA

93, 14895 – 14900 I Doctsch, F., García-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. (1999) *Regeneration of a germinai layer in the adult mammalian brain.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA

96, 11619 – 11624 Donoghue, M.J., Rakic, P. (1999 a) *Molecular gradients and compartments in the embryonic primate cerebral cortex.* Cereb. Cortex 9, 586 – 600

185

„Donoghue, M.J., Rakic, P. (1999 b) *Molecular evidence for the early specification of presumptive funcţional domains in the embryonic primate cerebral cortex.* J. Neurosei. 14, 5967 – 5979

Unul din primele studii care. arată că efrinele şi receptorii lor sunt exprimate diferenţiat la nivelul diverselor regiuni ale cortexului cerebral al primatelor, ceea ce ar putea sugera implicarea lor în ghidare proiecţiilor talamocorticale. Dunnett, S.B., Bjorklund, A. (1994) *Funcţional neuronal transplantation.* Raven, New York

Duvemoy, H.M. (1998) *The Htiman Hippocampus.* Springer, Berlin Ellis, H.M., Horvitz, H.R. (1986) *Genetic control oforogrammed cell death in the nematode C. elegans.* Cell 44, 817 – 829 Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C.

Peterson, D.A., Gage, F.H. (1998). *Neurogenesis in the. adult human hippocampus.* Nat. Med. 4, 1313 – 1317

Singurul studiu care a confirmat producerea neurogenezei în creierul uman, pe tot parcursul vieţii. Evans, M., Kaufman, M. (1981). *Establishment în culture of pluripotent cellstrom mouse emhryos.* Nature 292, 154 – 156 Erzurumlu, R.S., Kind, P.C. (2001) *Neural activity: sculptor of barrels in the neocortex.* Trends. Neurosei. 24, 589 – 595 Fallon, J. Reid, S., Kinyamu, R., Opole, L, Opo Je, R., Baratta, J „Korc, M., Endō.

T.L., Duong, A., Nguyen, G., Karkehabadhi, M., Twardzik, D., Patel, S".

Loughlin, S. (2000). *In vivo induction of massâve proliferation, directei migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 14686 – 14691

Fawcett, D.W. (1961) *Intercellular bridges.* Exptl. Cell. Res. Suppl. 8, 174 – 187 Finlay. B.L. (1992) *Cell death and the creation of regional differences în neuronal numbers.* J. Neurobiol. 23, 1159 – 1171 Finlay, B.L., Darlington, R.B. (1995) *Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains.* Science 268, 1578 – 1584 „Finâay, B.L., Slattery, M. (1983) *Local differences in the amount of early cell death în neocortexpredict localspecialization.* Science 219, 1349 – 1351

Unul din primele studii care demonstrează că apoptoza participă la regionalizarea izocortexu Sui. Finlay. B.L., Niederer, J. R. (1999) Neural development. În: Wilson, R.A., Keil.

F. C. (Eds.): *MIT Encyclopedia of Cognitive Science* (pp. 595 – 596). MIT

Press, Cambridge Fitzsimonds, R.M., Poo, M.M. (1998). *Retrograde signaling in the development and modification ofsynapses.* Physiol. Rev., 78. Freed, W.J., de Medinaceli, L., Wyatt, R.J. (1985) *Promotingfuncţionalplasticity in the damaged nervous sistem.* Science 227, 1544 – 1552 Freed. W.J., Perlow, M., Karoum, F., Seiger, A., Olson, L., Hoffer, B.J., Wyatt.

R. J. (1980) *Restoration of dopaminergic function by grafting offetal rat substantia nigra to the caudate nucleus: Long-term behavioral, biochemical, and histochemical studies.* Ann. Neurol. 8, 510 – 519

186

widespread and long-lasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS înjury. J. Celi Biol. 131, 453 – 464 Frost, D., Schneider, G. (1979) *Plasticity of retinofugal projections after parţial lesions of the retina în newborn syrian hamsters.* J. Comp. Neurol. 185.

517 – 568 Fujita, S. (1960) *Mitotic pattern and histogenesis of the central nervous sistem.*

Nature 185, 702 – 703 Fulton, J.F. (1948) *Funcţional localization in the frontal lobe and cerebellum.*

Clarendon Press, Oxford Fulton, J.F. (1953) *Physiologie des lobes frontaux et du cervelet.* Masson et c'**e**.

Paris

Gage, F.H. (2000) *Mammalian neural stern cells.* Science 287, 1433 – 1438 Gage, F.H. (2002) *Neurogenesis in the adult brain.* J. Neurosci 22, '612 – 613 Gaillard, A., Roger, M. (2000) *Early commitment of embryonic neocortical cells to develop area-specific thalamic connections.* Cereb. Cortex 10, 443 – 453 „Gao, W.-J., Pallas, S.L. (1999) *Cross-modal reorganization of horizontal connectivity în auditory cortex without altering thalamocortical projections.* J. Neurosci. 18, 7940 – 7950

Experimente în paradigma plasticităţii transmodale în care proiecţii retinale redirecţionate către cortexul auditiv determină reorganizarea conexiunilor orizontale, ceea ce indică faptul că specificarea ariilor corticale funcţionale este determinată de modalitatea inputurilor aduse de proiecţiile talamocorticale.

Geschwind, D.H., Qu, J., Easterday, M.C., Doughherty, J.D., Jackson, R.L., Chen.

Z., Antoine, H., Terskikh, A., Weissman, I.L., Nelson, S.F., Komblum.

H.I. (2001). *A genetic analysis of neural progenitor differentiation.* Neuron

29 325 – 339

I Gitton, Y.; Cohen-Tannoudji, M., Wassef, M. (1999) *Role of thalamic axons in the \ expression of H-2Z1, a mouse somatosensory cortex specific marker.*

Cereb. Cortex 9, 611 – 620 Gleeson, J.G., Walsh, C.A. (2000) *Neuronal migration disorders: from genetic diseases to developmentalmechanisms.* Trends Neurosci. 23, 352 – 359 jGlücksmann, A. (1951) *Cell death în normal vertebrate ontogeny.* Biol. Rev. 26.

59 – 86 jGoldowitz, D., Hamre, K. (1998) *The cells and molecules that make a cerebellum.*

Trends Neurosci. 21, 375 – 382 onzalez-Garcia, M., Gacia, I., Ding, L., O'Shea, S., Boix, L.H., Thompson, C.

B., Núñez, G. (1995) *bel-x is expressed în embryonic andpostnatal neural tissues andfunctions toprevent neuronal cell death.* Porc. Natl. Acad. Sci.

USA 92, 4304 – 4308 Gosh, A., Anatonini, A., McConnell, S.K., Shatz, C.J. (1990) *Requirement of subplate neurons in the formation of thalamocortical connections.* Nature

347, 179 – 181 Jâosh, A., Shatz, C.J. (1993) *A role for subplate neurons in the patterning of connections from thalamus to neocortex.* Development 117, 1031 – 1047

187

Gould, E., Reeves, A.J., Mazyar, F., Tanapat, P., Gross, C, Fuchs, E. (1999 a).

Hippocampal neurogenesis în adult Old-World primat es. Porc. Natl. Acad.

Sci. USA 96, 5263 – 5267 „Gould, E., Reeves, A., Graziano, M.S.A., Gross, C. (1999 b). *Neurogenesis in the neocortex of adult primates.* Science 286, 548 – 552

Marcarea cu bromodeoxiuridină demonstrează migrarea neuroblaştilor din zona;

subventriculară spre diferite zone din izocortexul primatelor adulte. Dat fiind că zonele corticale în care se agregă aceşti neuroni sunt cele care se presupune că susţin procesările cele mai complexe, autorii sugerează o posibilă implicare a neurogenezei adulte într-un turnover celular al izocortexului, relaţionat cu învăţarea. Gould. E., Vai!, N., Wagers, M., Gross, C.G. (2001) *Adult-generated hippocampal and neocortical neurons în macaques have a transient existence.* Porc.

Natl. Acad. Sci. USA 98, 10910 – 10917 Gould. E., Gross, C. G. (2002) *Neurogenesis în adult mammals: someprogress ani problems.* J. Neurosci. 22, 619 – 623 Greenough, W.T., Black, J.E., Wallace, C. S. (1996) Experience and Brain

Development. În: Johnson, M.J. (1996): *Bravi Development and*

Cognition (pp. 291 – 322). Blackwel! Publishers LTD, Oxford Greenough, W.T., Cohen, N.J., Juraska, J.M. (1999) *New neurons în old brains:!*

learning to survive? Nature Neurosci. 2, 203 – 205 Gritti, A., Ceva, L., Paraţi, E.A., Galii, R., Vescovi, A.L. (1995). *Basic fibroblM*

growth factor supports the proliferation of epidermal growth factor-generated neuronal precursor cells of the adult mouse CNS. Neurosci.

Lett. 185, 151 – 154 Gritti, A., Froiichsthal-Schoeller, P., Galii, R., Paraţi, E.A., Ceva, L., Pagano, S.

F., Björnsson, C, R., Vescovi, A.L. (1999) *Epidermal and fibroblastl growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipoteni stern cell-like population from the subventricular region of the adult mousn forebrain.* J. Neurosci. 19, 3287 – 3297 Gritti, A., Paraţi, E.A., Ceva, L., Frolichsthal, P., Galii, R., Wanke, E., FaravJS

L., Morasutti, D.J., Roisen, F., Nickel, D.D., Vescovi, A.L. (1996) 1

Multipotenţial stem-like cells from the adul mouse brain proliferate ana self-renew în response to basic fibroblast growth factor. J. Neurosci. 16.

1091 – 1100 „Gritti, A., Vescovi, A. L... Galii, R. (2002) *Adult neural stern cells: plasticity atm developmentalpotenţial.* J. Physiol. (Paris) 96, 81 – 90

Cea mai recentă sinteză despre celulele suşe neuronale. Gross „C. G. (2000) N*eurogenesis în adult brain: deaân of a dogma. Na*t. Rev.

Neurosci, 1, 67 – 73 Cu, Y., Sekiguchi. I, Gao, Y., Dikkes, P., Frank, K., Ferguson, D., Hasty, P".

Chun, J., Alt, F.W. (2000). *Defective embryorde neurogenesis în Ku!*

deficient but not DNA-dependent protein kinase catafytic subunit-deficient mice. Porc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 2668 – 2673

188

Hall, P.A., Watt, F.M. (1989). *Stern cells: the generation and maintenance of celular diversity.* Development 106, 619 – 633 Hamburger, V. (1948) *The mitoric patterns in the spinal cord of the chick embryo and the în relation to histogenetic processes.* J. Comp. Neurol. 88, 221 – 284 „Hamburger, V., Levi-Montalcini, R. (1949) *Proliferation, differentiation ano degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal am experimental conditions.* J. Exp. Zool. 111, 457 – 502

Un studiu exemplar al comportamentului mitotic ai neuronilor din ganglionii spinali din măduva spinării de la embrioi de găină. Prima descriere a mor

celulare rezultate din deprivarea de NGF şi; erarea ipotezei neurotrofice. Hamburger, V., Levi-Montalcini, R. (1950) Son aspects of neuroembriology. În

Weiss. P. (Ed.): *Genetic Neurology* (pp. 328 – 160). University of Chicago

Press, Chicago Hamori, J. (1969) Development of synaptic organization in the partially agranular and in transneuronally atrophied cerebellar cortex. În: Llinas, R. (Ed.):

Neurobiology of cerebellar evolution and deyelopment (pp. 845 – 858).

American Medical Association, Chicago Hastings, N.B., Gould, E. (1999). *Rapid extension ofaxons into the CA3 region by adult-generatedgranule cells.* J. Comp. Neurol. 413, 146 – 154 „Hatten, M. E. (1999) *Central nervous sistem neuronal migration.* A-nnu. Rev.

Neurosci. 22, 511 – 539

Unul din cele mai recente capitole despre migrarea neuronală. Henneman, E. (1974) The cerebellum. În: Mountcastle, V. B, (Ed.): *Medical*

Physiology (vol. I, pp. *122 – 141).* The C.V. Mosby Company, Saint Louis Hirano, M., Goldman, J.E. (1988). *Gliogenesis in the rat spinal cord: evidence for the origin of astrocytes and olygodendrocytes from radial precwsors.* J.

Neurosci. Res. 21, 155 – 167 His, W. (1889) *Die Neuroblasten und deren Entstehung im embryonalen Mark.*

Archiv. Anat. Enwicklungsgeschichte, 249 – 300 Hollyday, M. (2001) *Neurogenesis in the vertebrate neural tube.* Int. J… Devi.

Neuroscien ce 19, 161 – 173 Homayouni, R. Curran, T. (2000) *Cortical development: Cdk5 gets into sticky situations.* Curr. Biol. 10, R331-R334 Horton, H.L., Levitt, P. (1988) 4 *unique membrane protein is expressed on early developing Umble sistem axons and cortical targets.* J. Neurosci. 8, 4653

4661 Hubel, D.H., Wiesel, T.N. (1977) *Funcţional architecture of macaque monkey*

Visual cortex. Porc. Royai Soc. Lond. B. Biol. Sci. 198, 1 – 59 Huffman, K.J., Molnar, Z., Van Delle n, A., Kahn, D.M., Blekemore, C.

Krubitzer, L. (1999) *Formation of cortical fields on a reduced cortical sheet.* J. Neurosci. 19, 9939 – 9952 „Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, ML.

Soreq, H., Benvenisty, N. (2000). *Differentiation ofhuman embryonic stern cells into embryoid bodies comprising the three embyonic germ layers.*

Mol. Med. 6, 88 – 95

189

Celulele suşe neuronale proliferează în culturi de lungă durată şi, la retragerea mitogenilor, formează agregate de celule în diferite faze de diferenţiere, numite corpi embrioizi. Aceşti corpi embrioizi conţin celule din toate cele trei straturi embrionare, ectoderm, mezoderm şi endoderm. Johe, K., Hazel, T.G., Müller, T., Dogich-Diordjevik, M.M., McKay, R.D.G.

(1995). *Single factors direct the differnetiation of stern cells from thefetal and adult central nervous sistem.* Genes Dev. 10, 3129 – 3140 Johnston, M.V., Coyle, J.T. (1979) *Histological and neurochemical efects offetal treatment with methylazoxymethanol on rat neocortex în adulthood.* Brain.

Res. 170, 135 – 155 Kahn, D.M., Krubitzer, L. (2002) *Massive cross-modal plasticity and the emergence of a new cortical area în developmentally blând mammals.* Porc.

Natl. Acad. Sci. USA 99, *sub tipar* Kăllen, B. (1961) *Studies on cell proliferation in the brain of chick embryos with special reference to the mesencephalon.* Z. Anat. Enwicklungsgeschichte

122, 388 – 401 Källen, B. (1962) *Mitotic patterning in the central nervous sistem of chick embryos; Studiedby a colchicine method.* Z. Anat. Enwicklungsgeschichte

123, 309 – 319 Kalyani, A.J., Piper, D., Multaba, T., Lucero, M.T., Rao, M.S. (1998). *Spinal cord neuronal precursors generate multiple neuronal phenotypes în culture.* J.

Neurosci. 18, 7856 – 7868

Confirmarea pluripotenţialităţii celulelor suşe neuronale din măduva spinării. Kaplan, M.S. (1981) *Neurogenesis în 3-month-old rat visual cortex.* J. Comp.

Neurol. 195, 323 – 338 Kaplan, M.S. (1985) *Formation and twnover ofneurons in young and senescent animals: an electron microscopic and morphometric analysis.* Ann. N. Y.

Acad. Sci. 457, 173 – 192 Kaplan, M.S., Bell. D.H. (1984) *Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11*

month-old rodent hippocampus. J. Neurosci. 4, 1429 – 1441 Kaplan, M.S., Hinds, J.W. (1977) *Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light autoradiographs.* Science 197, 1092 – 1094 Katz, L. C, Shatz, C.J. (1996) *Synaptic activity and the construction of cortical circuits.* Science 274, 1133 – 1138 Keirsteas, H.S., Ben-Hur, T., Rogister, B., O'Leary, M.T., Dubois-Dalq.

Blakemore, W.F. (1999) *Polysalylated neural cell adhesion moleculepositive CNS precursors generate both oligodendrocytes and Schwann cells to remyelinate the CNS after transplatation.* J. Neurosci. 19, 7529

7536 Kemperman, G. (2002) *Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis.* J. Neurosci. 22, 635 – 638 Kemperman, G., Gage, F.H. (1999) *New nerve cells for the adult brain.* Sci. Am. 5

(May), 48 – 53 Kennedy, B.K., Austriaco, N.R., Zhang, J.S., Guarente, L. (1995) *Mutation in the silericing gene SIR4 con delay aging în S. cerevisiae.* Cell 80, 485 – 496

190

Kerr, J. (1965) A histochemical study of hypertrophy and ischaemic înjury of rat liver with special reference to changes în lysosomes. J. Pathol. Bacteriol.

90, 419 – 435 Kershnam, J. (1938). *The medulloblast and the medulloblastoma.* Arch. Neurol.

Psychiatry 40, 937 – 967 Keynes, R.J. (1987) *Schwann cells during neural development and regeneration:*

Leaders or followers? Trends Neurosci. 10, 137 – 138 Keyoung, H.M., Roy, N.S., Benraiss, A., Loissaint, A., Suzuki, A., Hashimoto, M.

Rashbaum, W.K., Okano, H., Goldman, S.A. (2001). *High-yield selection and extraction of two promoter-defined phenotypes of neural stern cells from thefatl human brain.* Nat. Biotechnol. 19, 843 – 850 Kingsburry, M.A., Finlay, B.L. (2001) *The cortex în multidimensional space:*

where de cortical areas come from? Dev. Sci. 4, 2, 125 – 156 Kingsburry, M.A., Miller, B., Finlay, B.L. (1995) *Increased subcortical and intracortical projections after early thalamic ablation in the hamster.* Soc.

Neurosci. Abstr. 21, 45 Kininer, C. (2002) *Neurogenesis în embryos and in adult neural stern cells.* J.

Neurosci. 22, 639 – 643 Knecht, S., Henningsen, H., Hohling, C, Elbert, T., Fior, H., Pantev, C, Taub, E.

(1998) *Plasticity of plasticity? Changes in the pattern of perceptual correlates ofreorganization after amputation.* Brain 121, 717 – 724 Komuro, H., Rakic, P. (1992) *Selective role of N-type calcium channels în neuronal migration.* Science 257, 806 – 809 Komuro, H., Rakic, P. (1993) *Modulation of neuronal migration by NMDA*

receptors. Science 260, 95 – 97 Komuro, H., Rakic, P. (1995) *Dynamics of granule cell migration: a confocal microscopic study în acute cerebellar slice preparations.* J. Neurosci. 15.

1110 – 1120 Komuro, H., Rakic, P. (1996) *Intracellular ca fluctuations modulate the rate of neuronal migration.* Neuron 17, 275 – 285 Komuro, H., Rakic, P. (1997) In vitro analysis of signal mechanisms involved în neuronal migration. În: Haynes, L.W. (Ed.): *The neuron în tissue culture.*

Wiley, New York „Komuro, FI, Rakic, P. (1998) *Distinct modes of neuronal migration in different domains ofdeveloping cerebellar cortex.* J. Neurosci. 18, 1478 – 1490

Descrierea modificărilor morfologice şi a vitezei de migrare a neuronilor granulari din scoarţa cerebeloasă, prin urmărirea traseului acestuia pe preparate de secţiuni acute. Metoda oferă avantajul urmăririi migrării celulei în condiţiile în care citoarhitectura înconjurătoare nu este modificată. Kornack, D.R., Rakic, P. (1995)

Changes în cell cycle kinetics during the development and evolution of primate neocortex. Porc. Natl. Acad. Sci.

USA 95, 1242 – 1246 Kornack, D.R., Rakic, P. (2001) *The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult brain.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 4752

4757

191

Korr, H. (1980). *Proliferation of different cell types in the brain.* Adv. Anat.

Embryol. Cell. Biol. 61, 1 – 72 Kraus-Rupert, R., Laissue, J., Burki, FI, Odartehenko, N. (1975). *Kinetic studies on glial, Schwann and capsular cells labeled with [H] thymidine în cerebrospinal tissue ofyoung mice.* J. Neurol. Sci. 26, 555 – 563 Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H., Gage, F.H. (1996). *Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitori proliferation.* J. Neurosci. 16, 2027 – 2033 Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C, Yang, D., Karasuyama. HL, Rakic, P…

Flavell, R.A. (1996) *Decreased apoptosis in the brain and premature]*

lethality in CPP 3 2-deficient mice. Nature 384, 368 – 372 Kuida, K., Haydar, T.F., Kuan, C.-Y., Cu, Y., Taya, C, Karasuyama, H., Su. M. S.

S., Rakic, P., Flavell, R.A. (1998) *Reduced apoptosis and cytochrome crediated caspase activation in mice lacking caspase 9.* Cell 94, 325 – 337 Kwon, Y.T., Tsai, L. FI. (1998) *A novei disruption of cortical development în p35 (-/) mice distinctfrom reeler.* J. Comp. Neuroi. 395, 510 – 522 Labbe, R., Firi, A. C, Mufson, E.J., Stein, D. G. (1983) *Fetal brain transplanta:*

Reduction deficits în rats with frontal cortex lesions. Science 217, 470 – 472 Langman, J. (1968). Histogenesis of the central nervous sistem. În: Bourne, G.H.

(Ed.): *The Structure and Function of Nervous Tissue:* Academic Press.

New York „Lavdas, A.A., Grigoriou, M, Pachnis, V., Parnavelas, J.G. (1999) *The medial ganglionic eminence gives râse to a population of early neurons in the developing cerebral cortex.* J. Neurosci. 19, 7881 – 7888

Primul studiu care demonstrează clar că neuroblaşti din eminenţa ganglionară medială migrează tangenţial spre cortexul

cerebral, unde capătă un fenotip GABA – ergic, specific interneuronilor corticali. Leblond, C.P. (1964) *Classification of cell populations on the basis of the în proliferative behavior.* Nat. Cvancer Inst. Monog. 14, 1**19 – 150** LeDoux, J. (1998) *Fear and the brain: Where have we been and where are we going?* Biol. Psychiatry 44, 1229 – 1238 Lee, M.H., Rabe, A. (1992) *Premature decline în Morris water mazeperformance ofaging mierencephalic rats.* Neurotoxicol. teratol. 14, 383 – 392 Lee, M.H., Rabe, A. (1998) *Protective efects of fetal neocortical transplants on cognitive function and neuron size în rats with congenital mierencephaly.*

Behav. Brain Res. 90, 147 – 156 Lemmon, V., Pearlman, A. L. (1981) *Does laminar position determine the receptive field properties of cortical neurons? A study of corticotectal cells în ar ea 17 of the normal mouse and the reeler mutant.* J. Neurosci. 1.83

93 Levi-Montalcini, R., Angeietti, P.U. (1965). The action of nerve growth factor on senzory and sympathetic cells. În: DeHaan, R.L., Ursprung, H. (Eds.):

Organogenesis (pp. 187 – 199). Holt, Rinehart & Winston, New York Levit1, P. (1984) *A monoclonal antibody to limbic sistem neurons.* Science 223.

299 – 301

192

Primul studiu care arată existenţa unei molecule cu expresie specifică structurilor din sistemul limbic. Levitt, P., Barbe, M.F., Eagleson, K.L. (1997) *Patterning and specification of the cerebral cortex,* Annu. Rev. Neurosci. 20, 1 – 24 Leywell, E.D., Rakic, P., Kukekov, V.G., Holland, E. C, Steindler, D.A. (2000)

Identification of a multipotent astrocytic stern cell in the immature and adult mouse brain. Porc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 13883 – 13888 Lidow, M.S., Rakic, P. (1994) *Unique profiles of the alpha 1 –, alpha 2 –, and betaadrenergic receptors in the developing cortical plate and transient embryonic zones of the rhesus monkey.* J. Neurosci. 14, 4064 – 4078 Lim., D.A., Alvarez-Buylla, A. (1999). *Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis.* Porc. Natl. Acad.

Sci. USA 96 Lynch, G., Deadwyler, D., Cotman, C.W. (1973) *Post lesion axonal growth produces permanent functional connections.* Science 180, 1364 – 1366 Lockshin, R., Williams, C. (1965)

Programmed cell death. II. Endocrine presentation of the breakdown of the intersegmental muscles în silkworms.

J. Insect. Physiol. 11, 803 – 809 Loeffler, M., Potten, C.S. (1997). Stern cells and celular pedigrees – A conceptual introduction. În: Potten, C.S. (Ed.): *Stem-like cells* (pp. 1 – 27). Academic

Press, Londra Lois, C, Alvarez-Buylla, A. (1993) *Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differenţiate into neurons and glia,* Porc.

Nat! Acad. Sci. USA 90, 2074 – 2077 „Lois. C, Alvarez-Buylla, A. (1994). *Long distance neuronal migration in the adult-mammalian brain.* Science, 264 1145 – 1148

Prima demonstrare clară a migrării tangenţiale a neuroblaştilor în reţeaua migratorie rostrală, din zona subventriculară spre bulbul olfactiv. Lois, C, García-Verdugo, X.M., Alvarez-Buylla, A. (1996) *Chain migration of neuronal precursors.* Science 271, 978 – 981 Lopez-Garcia/C, Molowny, A „García-Verdugo, J.M., Ferrer, I. (1988). De*layed postnatal neurogenesis in the cerebral cortex oflizards. Br*ain. Res. 471.

167 – 174 Lumpkin, C.K., Jr., McClung, J.K., Pereira-Smith, O.M., Smith, J.R. (1986)

Existence of high abundance antiproliferative messenger – RNAS în senescent human-diploidfibroblasts. Science 232, 393 – 395 Luskin, M. (1993) *Restrictedproliferation and migration of posânatally generated neurons derivedfrom ine forebrain subventricular zone.* Neuron M, 173

189 Malatesta, P., Hartfuss, E., Gotz, M. (2000) *Isolation of radial glâal cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage.* Development

127, 5253 – 5263 Mallamaci, A., Mercurio, S., Muzio, L., Cecchi, C, Pardini, C.L., Grüss, P.

Boncinelli, E. (2000) *The lack of Emx2 causes impairment of reelin*

193

signaling and defects of neuronal migration in the developing cerebral I

cortex. J. Neurosci. 20, 1109 – 1118 Mann, F., Zhukareva, V., Pimenta, A., Levitt, P., Bolz, J. (1998) *Membraneassociated molecules guide limbic and nonlimbic thalamocortical projections.* J. Neurosci. 18,

9409 – 9419 Marret, S., Gressens, P., Evrard, P. (1996) *Arrest of neuronal migration by excitatory amino acids în hamster developing brain.* Porc. Natl. Acad. Sci.

USA 93, 15463 – 15468 Marin-Padilia, M. (1978) *Dual origin of the mammalian neocortex andevolution of the corticalplate.* Anat. Embryol. 152, 109 – 126 Marm-Padilla, M. (1984) Neurons of layer I. A developmental analysis. În: Peters, I

A., Jones, E.G. (Eds.): *Cerebral Cortex. Celular Components of the Cerebral Cortex* (Voi I, pp. 447 – 478). Plenum, New York Marfn-Padilla, M. (1990) *Three-dimensional structural organization of layer I of the human cerebral cortex: A Golgi study.* J. Comp. Neurol. 299, 89 – 105 Marfn-Padilla, M. (1995) *Prenatal development of fibrous (white matter)*

protoplasmâc (gray matter), and layer I astrocytes in the human cerebral cortex: A Golgi study. J. Comp. Neurol. 357, 554 – 572 Martens, D.J., Tropepe, V., van der Kooy, D. (2000) *Separate proloferation kinetics of fibroblast growth factor-responsive and epidermal growth factor-responsive neural stern cells within the embryonic forebrain germinai zone.* J. Neurosci. 20, 1085 – 1095 Martin, D.P., Schmidt, R.E., DiStefano, P.S., Lowry, O.H., Carter, J. G.

Johnson, E.M. (1988) *Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation.* J. Cell.

Biol. 106, 829 – 844 Matsuo, A., Tooyama, L, Isobe, S., Oomura, Y., Akiguchi, I., Hanai, K., Kimura.

J., Kimura, H. (1994). *Immunohistochemical localization in the rat brain of an epitope corresponding to the fibroblast growth factor receptor-l.*

Neuroscience 60, 49 – 66 Mayer-Proschel, M., Kalyani, A., Multaba, T., Rao, M.S. (1997). *Isolation of lineage-restricted precursors from multipotent neuroevithelial stern cells.*

Neuron, 19, 773 – 785 McKay, R.D. (1989) *The origins of celular diversity in the mammalian central nervous systern.* Cell 58, 815 – 821 „McKay, R. (2000). *Stern cells – Hype andhope.* Nature 406, 361 – 364

O prezentare foarte comprehensivă a caracteristicilor celulelor suşe neuronale. McClelland, J.L., McNaughton, B.L., O'Reiily. (1995). *Why there are complementary learning sistems in the hippocampus and neocortex:*

Insights from the successes and failures of connectionist mode/s of learning and memory. Psychol. Rev. 102, 419 – 457 McClelland, J.L., Goddard, N.H. (1996) *Considerations arising from a complementary learning sistems perspective on hippocampus and neocortex.* Hippocampus 6, 654 – 665

194

Melino, G. (2002) *The meaning ofdeath.* Cell. Death Diff. 9, 347 – 348

Merry. D.E., Korsmeyer, S.J. (1997) *Bel-2 gene family in the nervous sistem.*

Annu. Rev. Neurosci. 20, 245 – 267 Metzstein, M.M., Stanfield, G.M., Horvitz, H.R. (1998) *Genetics oforogrammed cell death în C. elegans: past, present andfuture.* Trends. Genet. 14, 410

416 Miale, î. L., Sidman, R. L, (1961) *An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum.* Exp. Neurol. 4, 277 – 296 Miller, B., Chou, L., Finlay, B.L. (1993) *The early development of thalamocortical and corticothalamic projections.* J. Comp. Neurol. 335.

16 – 41

Unul din studiile fundamentale ale dezvoltării sistemelor de proiecţii dintre talamus şi cortex. Miller. B., Windrern, M.S., Finlay, B.L. (1991) *Thalamic ablations and neocortical development: alterations in thalamic and callosal connectivity.*

Cereb. Cortex 1, 241 – 261 Misson, J.P., Takahashi, T., Caviness Jr., V.S. (1991). *Ontogeny of radial and other astroglial cells în murine cerebral cortex.* Glia 4, 138 – 148 Miu, A. C, Andreescu, C, Vasiu, R., Olteanu, A.I. (2002 a) *Prolonged exposure to aluminum is associated with a progressive behavioral decline and neurodegeneration. Implications for Alzheimer's disease.* Clujul Medical, *sub tipar* I Miu, A. C, Andreescu, C, Vasiu, R., Olteanu, A.I. (2002 b) The Role of

Aluminum in the Pathogenesis of Alzheâmer-like encephalopathy. În:

Mureşan, A., Orăşan, R. (Eds.): *Stresul oxidativ în procese fiziologice şi patologice* (pp.92 – 94). Presa Universităţii de Medicină şi Farmacie „Iiâliu

Haţieganu", Cluj-Napoca Miu, A. C, Olteana, A.*I.* (2002) *Catatonia în Alzheimer's disease; The role of the amygdalo-hippocampal circuits.* Brain Behav. Sci. (Cambridge), 25, 3, *sub tipar* foore, R.Y., Bjorklund, A., Stenevi, U. (1971) *Plastic changes in the adrenergic*

innervation of the rat septal area în response to denervation. Brain. Res. 33, 13 – 35 Morest, D.K. (1970) *A study of neurogenesis in the forebrain of opossum pouch young.* Z. Anat. Entwiclungsgeschichte 130, 265 – 305 Morshead, C.M., van der Kooy, D. (1992). *Postmitotic death is the fale of constitutively proliferating cells in the subependymal layer of the adult mouse brain.* J. Neurosci. 12, 249 – 256 iorsheau, CM., Reynolds, B.A., Craig, C.G., McBurney, M.W., Staines, W.A.

Morassutti, *D.,* Weiss, S., van der Kooy, D. (1994). *Neuralstem-like cell in the adult mammalian forebrain: a relatively quiesceni subpopulation of subependymal cells.* Neuron 13, 1071 – 1082 lorshead, CM., Craig, C.G., van der Kooy, D. (1998). *In vivo donai analyses reveal the properties of endogenous neural stern cell proliferation in the adult mammalian forebrain.* Development 125, 2251 – 2261

195

Mountcastle, V.B. (1997) *The columnar organization of the neocortex.* Brain 120.

701 – 722

Mountcastle, V.B., Poggio, G.F. (1974) Structural organization and general;... physiology of thalamoencephalic sistems. În: Mountcastle, V.B. (Ed.):

Medical Physiology (vol. I, pp. 722 – 747). The C, V. Mosby Company.

Saint Louis „Nadajarah, B., Brunstrom, J.E., Grutzendler, J., Wong, R.O., Pearlman, A. L.

(2001) *Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex.* Nature Neurosci. 4, 143 – 150

Prima confirmare directă a translocării corpului neuronal ca modalitate de migrare în cortexul cerebral în dezvoltare. „Nadajarah, B., Alifragis, P., Wong, R.O., Parnavelas, J.G. (2002) *Ventrickdirected migration in the developing cerebral cortex.* Nature Neurosci. 5.

218 – 224

Descrierea unei modalităţi de migrare a neuronilor din zonele proliferative ventrolaterale ale telencefalului. care sugerează implicarea ventriculilor laterali în ghidarea migrării acestor celule. „Nadajarah, B., Parnavelas, J.G. (2002) *Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex.* Nature Rev. Neurosci. 3, 423 – 432

O excelentă prezentare a modurilor de migrare a neuronilor din

cortexul cerebral în dezvoltare. Nagakawa, Y., Johnson, J.E., O'Leary, D.D. (1999) *Graded and areal expression patterns of regulatory genes and cadherins în embryonic neocorta*

Independent of thalamocorticalinput. J. Neurosci. 19, 10877 – 10885 Nakayama, >Tr, Goshima, Y., Misu, Y., Rato, X (1999) *Role of Cdk5 andtm phosphorilation in heterometric Ciprotein-mediated retinal growth.com!*

coiiupse. J. Nearobiol. 41.326 – 339 i

Nikolic, M., Chou, M.M., Lu, W, Mayer, B.J., Tsai, L H (1998) *The: p35/Cdkf kinase is a neuron-specific Rac efector that inhibits Pakl activity.* Nature

395, 194 – 198 Nauta, W. JJH., Feirtag, M. (1986) *Fundamental neuroanatomy.* W.H. Freemaii and Coi, New York Neyt, C, Welch, M., Langst On, A., Kohtz, J., Fishe!!; G. (1997) *A shert-rc*

signal restricts cell movement between telencephalic proliferative zones. J.

Neurosci, 17, 9194 – 9203 'Noctor, S. C, Flint, A. C, Wissman, T.A., Dammerman, R.S., Kriegstein, A. R

(2000) *Neurons derived from radial glial cells establish radial units a neocortex.* Nature 409, 714 – 719

Cercetare în care se confirmă faptul că celulele gliale radiale se pot diferenţia!!

neuroni. Autorii sugerează că relaţia clonală dintre neuroni şi celulele gliale radiale ar putea oferi o perspectivă nouă asupra formării unităţilor radiale, Nothias, F., Fishell, G., Ruiz y Altaba, A. (1998) *Cooperation of intrinsic ani extrinsic signals in the elaboration of regional identity in the posteriot cerebral cortex.* Curr. Biol. 8, 459 – 462. Nottebohm, F. (1989). *From birdsong to neurogenesis.* Sci. Am. 260, 74 – 79

196

„Nottebohm, F. (2002) *Why are some neurons replaced în adult brain?* J.

Neurosci. 22, 624 – 628

Nottebohm analizează posibilul suport pe care l-ar putea oferi neurogeneza adultă pentru învăţare. Nowakowski, R.S. (1996) Basic concepts of CNS development. În: Johnson, M. J.

(Ed.): *Brain development and cognition* (pp. 54 – 92). Blackwell Publishers

LTD, Oxford Nowakowski, R.S., Rakic, P. (1974) *Decrease of exogenous thymidine-H3 in the pasma of pregnant rhesus monkeys.* Cell. Tissue Kinet. 7, 189 – 194 'Nowakowski, R.S., Lewin, S.B., Miller, M. W. (1989) *Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lenghts of the cell cycle and the*

DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. J. Neurocytol. 18, 311 – 318

Descrierea caracteristicilor bromodeoxiuridinei, derivat al timinei care este încorporat de celulele care ies din mitoză. Nowakowski, R.S., Rakic, P. (1981) *The site of origin and route and rate of migration of neurons to the hippocampal region of the rhesus monkey.* J.

Comp. Neurol. 196, 129 – 154 'Nowakowski, R.S., Hayes, N. L. (2001) *Stern cells: The promises and pitfalls.*

Neuropsychopharmacology, 25, 799 – 804

O analiză critică a proprietăţilor celulelor suşe, a diferenţelor dintre proprietăţile acestor celule *in vitro* faţă de condiţii *in vivo* şi a limitelor metodologice ale încorporării bromodeoxiuridinei ca marker al celulelor proliferative din sistemul nervos în dezvoltare şi adult. Obst-Pernberg, K., Medina, L., Redies, C. (2001) *Expression of R-cadherin and Neadherin by cell groups andfiber tracts in the developing mouse forebrain:*

Relation to theformaiion of funcţional circuits. Neuroscience 106, 505 – 533 Odorico, J.S., Kaufman, D.S., Thomson, J.A. (2001), *Multilineage differentiation fromhuman embryonic stern cell lines.* Stern Cells, 19, 193 – 204 O'Keefe, J., Nadei, L. (1978) *The hippocampus as a cognitive map.* Clarendon

Press, Oxford O'Kusky, J.R., Colonnier, M. (1982) *Postnatal changes in the number of neurons and synapses in the visual cortex (area 17) of the macaque monkey: A*

stereological analysis în normal and monocularly deprived animals. J.

Comp. Neurol. 210, 291 – 306 O'Leary, D.D.M. (1989) *Do cortical areas emerge from a protocortex?* Trends

Neurosci. 12, 400 – 406 O'Leary, D.D.M., Stanfield, B.B. (1989) *Selective elimination ofaxons extended by developing cortical neurons is dependent on regional locale:*

experiments utilizingfetal cortical transplants, J. Neurosci. 9,

2230 – 2246 O'Leary, D.D.M., Bicknese, A.R., De Carlos, J.A., Heffner, C.D., Koester, S.

E., Kutka, L.J., Terashima, T. (1990) *Target selection by cortical axons:*

alternative mechanisms to establish axonal connections in the developing brain. Cold Sping Hârb. Symp. Quant. Biol. LV, 453 – 468

197

O'Leary, D.D.M., Schlaggar, B.L., Stanfield, B.B. (1992) *The specification of senzory cortex: lessons from cortical transplantation.* Exp. Neurol. 115.

121 – 126 „O'Leary, D.D. M, Nagakawa, Y. (2002) *Patterning centers, regulatory genes and extrinsic mechanisms controlling arealization of the neocortex.* Curr.

Neurobiol. 12, 14 – 25

O sinteză foarte recentă care pune în valoare numeroase date experimentale care susţin că regionalizarea izocortexului este controlată coordonat de centre care sunt surse de molecule de semnalizare, de expresia limitată spaţio-temporal a unor gene şi de mecanisme extrinseci, cum ar fi activitatea electrică evocată de proiecţiile talamocorticale. Olteanu, A, (1980) *Reglarea eritropoiezei în perioada fetală şi neonatală.* Teză de doctorat, IMF Cluj-Napoca

Olteanu, A., Lupu, V., Miu, A. (2001) *Neurofiziologia comportamentului uman.*

Presa Universitară Clujeană, Cluj-Napoca O'Reilly, R. C, Rudy, J.W. (2001) *Conjunctive representations in learning and memory: principles of cortical and hippocampal function.* Psychol. Rev.

108, 311 – 345 O'Rourke, N.A., Dailey, M.E., Smith, M.J., McConnell, S.K. (1992) *Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex.* Science 258, 299

302 O'Rourke, N.A., Sullivan, D.P., Kaznowski, C.E., Jacobs, A.A., McConnell, S.

K. (1995) *Tangenţial migration of neurons in the developing cerebral cortex.* Development 121, 2165 – 2176 Pagano, S.F., Impagnatiello, F., Girelli, F., Ceva, L., Grioni, E., Onofri, M.

Cavallaro, M., Etteri, S., Vitello, F., Giombini, S., Solero, C.L., Paraţi, E.

A. (2000) *Isolation and characterization of neural stern cells from the adult human olfactory bulb.* Stem Cells 18, 295 – 300 Paglini,

G., Pigino, G., Kunda, P., Morfini, G., Maccioni, R., Quiroga, S., Ferreira.

A., Cáceres, A. (1998) *Evidence for the participation of the neuronspecific Cdk5 activator p35 during laminin-enhanced axonal growth.* J.

Neurosci. 18, 9858 – 9869 Pallas, S. (2001) *Intrinsic and extrinsic factors that shape neocortical specification.* Trends Neurosci. 24, 417 – 423

O autoritate în problematica regionalizării cortexului cerebral analizează rolul factorilor extrinseci şi intrinseci în formarea hărţii funcţionale a izocortexului. „Pallas, S.L., Littman, T., Moore, D. R. (1999) *Cross-modal reorganization of callosal connectivity without altering thalamocortical projections.* Porc.

Natl. Acad. Sci. USA 96, 8751 – 8756

Experimente în care se demonstrează că inputuri vizuale deviate către cortexul auditiv determină reorganizarea şi reducerea numărului de conexini interemisferice calosale ale acestei zone a izocortexului. Pearlman, A.L. (1985) The visual cortex of the normal mouse and the reeler mutant. În: Jones, E.G., Peters, A.A. (Eds.): *The cerebral cortex. Visual cortex* (pp. 1-18). Voi. 3. Plenum, New York

198

Pellegrini, M., Mansouri, A., Simeone, A., Boncinelli, E., Grüss, P. (1996) *Dentate gyrus formation requires Emx2.* Development 122, 3893 – 3898 Pinel, J.P.J. (1990). *Biopsychology.* AHyn & Bacon, London Pinto-Lord, M. C, Evrard, P., Caviness, V.S., Jr. (1982) *Obstructed neuronal migration along radial glialfibers in the neocortex of the reeler mouse: A*

Golgi-Em analysis. Dev. Brain Res. 4, 379 – 393 Prăsăd, D., Graf, E., Kingsburry, M.A., Clancy, B., Finlay, B.L. (1999)

Development of callosal and cortico-cortical projections in neonatal hamster isocortex. Soc. Neurosci. Abstr. 25, 504 Provis. J.M., Penfold, P.L. (1988) *Cell death and the eelimination of retina! axons during development.* Prog. Neurobiol. 31, 331 – 347 Puelles, L. (1995) *A segmentai morphological paradigm for understanding vertebrate forebrains.* Brain. Behav. Evol. 46, 319 – 337 Purves, D. (1988) *Body and brain: A trophic theory of neural connections.* Harvard

Press, Cambridge Quartz, S.R., Sejnowski, T.J. (1997) *The neural bases of cognitive development: A constructivist manifesto.* Brain. Behav. Sci. 20, 537

596 Ragsdale, C.W., Grove, E.A. (2001) *Patterning the mammalian cerebral cortex.*

Curr. Neurobiol. 11, 50 – 58 Raisman, G. (1969) *Neuronal plasticity in the septal nudei of the adult rat.* Brain

Res. 14, 25 – 48 „Rakic, P. (197 la) *Guidance ofneurons migrating to thefetal monkey neocortex.*

Brain Res. 3, 471 – 476

Una din cele mai frumoase descrieri a migrării neuronilro cu ajutorul celulelor gliale radiale. Rakic, P. (197 lb) *Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing ceretyellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study în*

Maccacus rhessus. J. Comp. Neurol. 141, 283 – 312 Rakic, P. (1972) *Mode of cell migration to the superficial layers offetal monkey neocortex.* J. Comp. Neurol. 145, 471 – 476 Rakic, P. (1975 a) *Cell migration and neuronal ectopias in the brain.* Birth Defects:

Original Article Series, 11, 95 – 129 Rakic, P. (1975 b) Timing of major ontogenetic events in the visual cortex of the rhesus monkey. În: *Brain mechanisms în mental retardation* (pp. 3 – 40).

Academic Press, New York Rakic, P. (1976) *Prenatal genesis of connections subserving ocular dominance in the rhesus monkey.* Nature 261, 467 – 471 Rakic, P. (1977 a) *Genesis of dorsal lateral geniculate nucleus in the rhesus monkey: site and time of origin, kinetics of proliferation, routes of migration and pattern of distribution ofneurons.* J. Comp. Neurol. 176, 23

52 Rakic, P. (1977 b) *Prenatal development of the visual sistem în rhesus monkey.*

Porc. Royal. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 278, 245 – 260

199

Rakic, P. (1985 a) Contact regulation of neuronal migration. În: Edelman, G. M.

Thierry, J.P. (Eds.), *The cell în contact: adhesions and junctions as morphogenetic determinants* (pp. 67 – 91). Neuroscience Research

Foundation, Cambridge

Rakic, P. (1985 b). *Limits of neurogenesis imprimates.* Science 227 „Rakic, P. (1988) *Specification of cerebral cortical areas.* Science 241, 170 – 176

Un articol de referinţă în care Rakic abordează regionalizarea izocortexului. Rakic, P. (1990) *Principles of neural cell migration.*

Experientia 46, 882 – 891 „Rakic, P. (1995 a) *Radial versus tangenţial migration of neuronal clones in the developing cerebral cortex.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 11323 – 11327

Evaluarea unor noi probe în favoarea migrării radiale şi a ipotezei unităţii radiale.

Un text sintetic şi foarte util ca ancoră pentru concepţia lui Rakic asupra dezvoltării şi evoluţiei creierului. Rakic, P. (1995 b) *A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis ofneocortical expansion during evolution.* Trends. Neurosci. 18, 383 – 388 Rakic, P. (2002) *Adult neurogenesis în mammals: an identity crisis.* J. Neurosci.

22, 614 – 618 „Rakic, P., Knyhar-Csillik, E., Csillik, B. (1996) *Polarity of microtubuk assemblies during neuronal cell migration.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 93.

9218 – 9222

Un studiu provocator care descrie contribuţia microtubulilor din procesul conducător, dar nu şi din procesul posterior al celulei granulare în dinamica sa de migrare. Rakic, P., Kornack, D. (1993). *Construints of neurogenesis în adult primate brain:*

an evolutionary advantage?. Rest. Neurol. 6, 257 – 266 Rakic, P., Stensas, L.J., Sayre, E., Sidman, R.L. (1974) *Computer-aided threedimensional reconstruction and quantitative analysis of cells from serial microscopic montages offoetal monkey. brain.* Nature 250, 31 – 34 Rakic, P., Suner, I., Williams, R.W. (1991) 4 *novei cytoarchitectonic area inducea experimentally within primate visual cortex.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA

88, 2083 – 2087 „Rakic, S., Zecevic, N. (2000) *Programmed cell death in the developing human telencephalon.* Eur. J. Neurosci. 12, 2721 – 2734

O excelentă descriere imunohistochimică a apoptozei dintelencefalul uman embrionar şi fetal. Sunt indicate două tipuri de apoptoză, una relaţionată cu proliferarea precursorilor neuronali şi cealaltă sincronizată cu sinaptogeneza şi formarea circuitelor nervoase. Ramón y Cajal, S. (1906) *The structure and connexions of neurons.* (Prelegere

Nobel) Physiol. or Med. Ramón y Cajal, S. (1911) *Histologie du sisteme nerveux. de l'homme et des vertebres.* Voi. II, Malonine, Paris Rao, M.S., Mayer-Proschel, M. (1997). *Glial-restricted precursors are*

derived from multipotent neuroepithelial stern cells. Dev. Biol. 188, 48 – 63 Redies, C, Ast, M., Nagakawa, S., Takeichi, M, Martinez-de-la-Torre, M.

Puelles, L. (2000) *Morphological fate of diencephalic neuromeres and*

200

their subdivisions revealed by mapping cadherin expression. J. Comp.

Neurcă. 421, 481 – 514 Reid, C.B., Liang, I., Walsh, C. (1995). *Sistematic widespread donai organization in cerebral cortex.* Neuron 15, 1 – 20 Reynolds, B.A., Weiss, S. (1996). *Clonal andpopulations analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic precursor is a stern cell.*

Dev. Biol. 175, 1-13 Reztiikov, K., Acklin, S.E., van der Kooy, D. (1997). *Clonal heterogeneity in the early embryonic rodent cortical germinai zone and the separation of subventricular from ventricular zone lineages.* Dev. Dyn. 210, 328 – 343 Richards, L.J., Kilpatrick, T.J., Bartlett, P.F. (1992) *De novo generation of neuronal cellstrom the adult mouse brain.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 89.

8591 – 8595 Rickmann, M, Chronwall, B.M., Wolff, J.R. (1977) *On the development ofnonpyramidal neurons and axons outside the cortical plate: the early marginal zone as apallial anlage.* Anat. Embryol. 151, 285 – 307 Rockland, K.S. (1998) *Complex microstructures of senzory cortical connections.*

Curr. Neurobiol. 8, 545 – 551 Roe, A.W., Pallas, S.L., Hahm, J., Sur, M. (1990) *A map ofvisual space induced în primary auditory cortex.* Science 250, 818 – 820 Roe, A.W., Pallas, S.L., Kwon, Y., Sur, M. (1992) *Visual projections routed to the auditory pathway în ferrets: receptive fields of visual neurons în primary auditory cortex.* J. Neurosci. 12, 3651 – 3664 Rossi, D.J., Siater, N.T. (1993) *The developmental onset of NMDA receptor channel activity during neuronal migration.* Neuropharmacology 32.1239

1248 Sarnat H.B. (1995). *Ependymal reactions to înjury. A review.* J. Neuropath. Exp.

Neurol. 54, 1-15

Sauer, F.C. (1935 a) *The celular structure of the neural tube.* J. Comp. Neurol. 63, 13 – 23

Sauer, F.C. (1935 b) *Mitosis in the neural tube.* J. Comp. Neurol.

62, 377 – 405 „Sauer, F.C. (1936) *The interkinetic migration of embryonic epithelila nudei.* J.

Morphol. 60, 1-11

Studiu în care este descrisă pentru prima dată migrarea interkinetică a celulelor neuroepiteliale. Sauer, F. C, Walker, B. E. (1959) *Radioautographic study of interkinetic nuclear migration in the neural tube.* Porc. Soc. Exptl. Biol. Med. 101, 557 – 560 Scalia, F. (1987) *Synapse formation in the olfactory cortex by regenerating optic axons: ultrastructural evidence for polyspecific chemoaffinity.* J. Comp… Neurol. 263, 497 – 513 Schneider, G.E. (1973) *Early lesions of the superior colliculus: Factors affecting the formation of abnormal retinal projections.* Brain Behav. Evol. 8, 73

109 Schuldiner, ML, Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D.A., Benvenisty, N.

(2000) *Efect of eight growth factors on the differentiation ofcells derived*

201

from human mebryonic stern cells. Porc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 11307

'11312 Sediv>, J.M. (1998) *Can ends justify the means?: Telomeres and the mecganisms of replicative senescence and immorlalization in mammalian cells.* Porc.

Natl. Acad. Sci. USA 95, 9078 – 9081 Sestan, N., Rakic, P., Donoghue, M.J. (2001) *Independent parcellation of the embryonic visual cortex and revealed by combinatoria! Eph/ephrin gene expression.* Curr. Biol. 11, 39 – 43 Shamblott, M.J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E.M., Littiefield, J.W., Donovan.

P. J., Blumenthai, P.D., Huggins, G.R., Gearhart, J.D. (1998) *Derivation of pluripotent stern cells from cultured human primordial germ cells.* Porc.

Natl. Acad. Sci. USA 95, 13726 – 13731 Shamblott, M.J., Axelman, J., Littiefield, J.W., Blumenthai, P.D., Huggins, G. R…

Cui, Y., Cheng, L., Gearhart, J. D, (2001) *Human embryonic germ cells derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 113 – 118 Shatz, C.J. (1996) *Emergence of order în visual sistem development.* Porc. Natl.

Acad. Sci. USA 93, 602 – 608 Shatz, C. 1, Chun, J.J.M., Lrskin, M.B.

(1988) The role of the subplate in the development of the mammalian telencephalon. În: Peters, A., Jones, E. G.

(Eds.): *The cerebral cortex* (voi. 7). Pienum Press, New York Shors, T.J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., Gould, E. (2001)

Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories.

Nature 410, 372 – 375 Sidman, R.L., Miale, I.L. (1959). *Histogenesis in the mouse cerebellum studiedby autoradiography with tritiated thymidine.* Anat. Rec. 133, 429 – 430 Smart, I. (1961). *The subependymal layer of the mouse brain and its cell proditetion as shown by radioautography after thymidine-H injection.* J.

Comp. Neural…116, 325 – 338 „Snyder, E. Y… Yoon, C, Flax, J.D., Macklis, J.D. (1997) *Multipotent neural precursors can differenţiate toward replacement of neurons undergoing targeted apoptotic degeneration in adult mouse neocortex.* Porc. Natl. Acad.

Sci. USA 94, 1I663 – 11668

Neuronii piramidali la care a fost indusă focal apoptoza sunt înlocuiţi de neuroni care se diferenţiază din celule suşe injectate intraventricular şi reconstituie perfect proiecţiile corticotalamice alterate de apoptoză. Stanfield, B.B., Caviness, V.S., Jr., Cowan, W. M. (1979) *The organization of certain afferents to the hippocampus and dentate gyrus în normal and reeler mouse.* J. Comp. Neuroî. 185, 461 – 484 Stanfield, B.B., Cowan, W.M. (1988) The development of the hippocampal region. În: Peters, A., Jones, E.G. (Eds.): *Development and maturation of the cerebral cortex. Cerebral Cortex* (pp. 91 – 131). Voi. 7. Pienum, New

York

202

Stanfield, B.B., O'Leary, D.D.M. (1985) *Fetal occipital cortical neurons transplanted to the rostral cortex can extend and maintain a pyramidal tract axon.* Nature 313, 135 – 137 Sâein, D.G. (1988) Practicai and teoretical issues in the uses of fetal brain tissue transplants to promote recovery from brain înjury. În: Levere, T. e., Almli.

C. R., Stein, D.G. (Eds.): *Brain înjury and recovery: Teoretical and controversial issues* (pp. 249 – 272). Plenum Press, New York Steriade, M. (2001) *The GABA – ergic reticular nucleus: A preferenţial target of corticothalamicprojecţionsJProc.* Nat! Acad. Sci. USA 98, 3625 – 3627

Steriade, M., Jones, E.G., McCormick, D.A. (1990) *Thalamus.* vol. I:

Organisation and function. Elsevier, Oxford Steriade, M., Timofeev, I. (2001) *Corticothalamic operations through prevalent inhibition of thalamocortical neurons.* Thal. Related Syst. 1, 225 – 236 Stewait, S.A., Hahn, W. C, O'Connor, B.F., Banner, E.N., Lundberg, A. S.

Modha, P., Mizuno, H., Brooks, M.W., Fleming, M., Zimonjic, D. B…

Popescu, N. C, Weinberg, R.A. (2002) *Telomerase contributes to twnorigenesis by a telomere length-independent mechanism.* Porc. Natl.

Acad. Sci, USA 99, *sub tipar* „Sur, M., Garraghty, P.E., Roe, A. W. (1988) *Experimentally induced visual projections into auditory thalamus and cortex.* Science 242, 1437 – 1441

Experimente care au readus în atenţie paradigma plasticităţii transmodale şi au oferit argumente elegante pentru contribuţia proiecţiilor talamocorticale în specificarea hărţii funcţionale a izocortexului. Sur. M., Pallas, S, L., Roe, A.W. (1990) *Cross modal plasticity în cortical development: differenliation and specification of senzory cortex.* Trends

Neurosci. 13, 227 – 233 Sur. M., Learney, C.A. (2001) *Development and plasticity of cortical areas and networks.* Nat. Rev. Neurosci. 2, 251 – 262 Suzuki, W.A., Clayton, N.S. (2000) *The hippocampus and memory: a comparative and ethologicalperspective.* Curr. Opin. Neurobiol. 10, 768

773 Sweet, H.O., Bronson, R.T., Johnson, K.R., Cook, S.A., Davisson, M.T. (1996)

Scrambler, a new neurological mutation of the mouse with abnormalities of neuronal migration. Mamm. Genome 1, 798 – 802 Quaitz, S.R., Sejnowski, T.J. (1997). *The neural bases of cognitive development: A*

constructivist manifesta. Behav. Brain Sci. 20, 537 – 596 Takahashi, T., Nowakowski, R.S., Caviness Jr., V.S. (1996) *Cell cycle parameters and patterns of nuclear movement in the neocortical prouferative zone of the fetal mouse.* J. Neurosci. 13, 820 – 833 Takahashi, T., Nowakowski, R.S., Caviness Jr., V.S. (1996) *The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall* J. Neurosci. 15, 6046 – 6057 Takahashi, T., Nowakowski, R.S., Caviness Jr., V.S. (1996) *Interkinetic and migratory behavior of a coborî of neocortical neurons arising in the early embryonic murine*

cerebral wall. J. Neurosci. 16, 5762 – 5776
203

Tanapat, P. Hastings, N.B., Reeves, A.J., Gouid, E, (1999) *Estrogen stimulates a transient increase in the number ofnew neurqns în dentate gyrus of the adultfemale rat.* J. Neurosci. 19, 5792 – 5801

Tarabykin, V., Stoykova, A., Usman, N., Grüss, P. (2001) *Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by Svetl gene expresion.* Development 128, 1983 – 1993

Dovezi preliminare care indică expresia foarte specifică a doi factori de transcripţie, *Svet-l* şi *Otx-l,* primul fiind exprimat în zona ventriculară, iar cel de-al doilea în zona ventriculară. Sunt analizate comparativ domeniile acestor două gene la şobolani normali şi REELER.

Tata, J.R. (1966) *Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail în organ culture.* Dev. Biol. 13, 77 – 94

Taupin, P., Ray, J., Fischer, W.H., Suhr, S.T., Hakansson, K., Grubb, A., Gage, F.H. (2002) *FGF-2-responsive neural stern cell proliferation requires CCg, a novei autocr ine/par aer ine cofactor.* Neuron 28, 385 – 397

Ten Donkelaar, H.J. (1998). Reptiles. În: Nieuwenhuys, R., Ten Donkelaar, H.J., Nicholson, C. (Eds.): *The central nervous sistem ofvertebrates* (pp. 1315 – 1524). Springer, Berlin

Thomson, J.A., Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris, C. P „Becker, R.A., Heam, J.P. (1995) I*solation of a primate embryonic stern cell lyne.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7844 – 7848

Thomson, J.A., Marshall, V.S. (1998) *Primate embryonic stern cells.* Curr. Topics Dev. Biol. 38, 133 – 165

Tole, S., Christian, C, Grove, E. (1997) *Early specification and autonomous development of cortical fields in the mouse hippocampus.* Development 124, 4959 – 4970

Tropepe, V., Sibilia, M, Ciruna, B.G., Rossant, J., Wagner, E.F., van der flooy, D. (1999). *Distinct neural stern cells proliferate în response to EGF and FGF2 in the developing mouse telencephalon.* Dev. Biol. 208, 166 – 188

Tuttle, R., Braisted, J.E., Richards, L.J., O'Leary, D.D.M. (1998) *Retinal axon guidance by region-specific cues în diencephalon.* Development 125, 791 – 801

Este confirmat rolul unor gradiente moleculare în chemoghidarea axonilor din tractul optic pe teritoriul diencefalului. Aceste molecule nu sunt identificate, dar este discutat succint rolul SHH. Studiu cu o iconografie deosebită.

Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M, Phan, T.V., Tsukamoto, A., Gage, F.H., Weissman, I.L. (2000) *Direct isolation of human central nervous sistem stern cells.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 14720 – 14725

Uylings, H. B, M., Delalle, I. (1997) *Morphology of NPY-ir neurons andfibers in human prefronta' cortex during prenatal and postnatal development.* J. Comp. Neurol. 397, 523 – 540

Uylings, H.B. ML, van Pelt, J., Parnavelas, J.G., Ruiz-Marcos, A. (1994) Geotnetrical and topological characteristics in the dendritic development of cortical pyramidal and non pyramidal neurons. În: van Pelt, J., Corner, M.

204

A., Uylings, H.B.M., Lopes da Silva, F.H. (Eds.): *Progress în brain research.* Voi. 102: The self-organizing brain: From growth cones to funcţional networks (pp. 109 – 123). Elsevier, Amsterdam Uzman, L.L. (1960) *The histogenesis of the mouse cerebeliwn as studied by its tritiated thymidine luptake.* J. Comp. Neurol. 114, 137 – 159 Van Praag, H., Christie, B.R., Sejnowski, T.J., Gage, F.H. (1999). *Running enhances neurogenesis, learning and long-term potentiation in mice.* Porc.

Natl. Acad. Sci. USA 96

Condiţiile de stimulare ecologică („mediu îmbogăţit") şi, în particular, posibilitatea exploratorie şi activitatea fizică, favorizează neurogeneza adultă.

Acestea sunt printre primele experimente care **arată** că neuronii rezultaţi în urma **neurogenezei adulte au o probabilitate mai mare de a afişa potenţare de lungă durată (LTP), o formă de plasticitate sinaptică care se consideră că ar fi corelatul celular al învăţării. „Vaux. D.L., Strasser, A. (1996) *The molecular biology ofapoptosis...* Porc. Natl.**

Acad. Sci. USA 93, 2239 – 2244

O prezentare destul de detaliată a cascadelor moleculare care controlează apoptoza. Veis, D.J., Sorenson, C.M., Shutter, J.R., Korsraeyer, S.J. (1993) *Bel-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmentedhair.*

Cell 75, 229 – 240 Vogt, C. (1842) ***Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der***

Geburtshelerkroete (Alytes obstetricians). **Jent & Gassman, Solothurn Waechter, R., Jaensch, B. (1972)** ***Generation times of the matrix cells during embryonic brain development: an autoradiographic study în rats.*** **Brain**

Res. 46, 235 – 250 „Walsh, C, Cepko, C.L. (1992) ***Widespread dispersion of neuronal clones across funcţional regions of the cerebral cortex.*** **Science 255, 434 – 440**

Unul din primele studii în care este confirmată migrarea tangenţială a neuronilor în cortexul cerebral şi este discutată ipoteza unităţilor radiale care se consideră că nu poate justifica relaţia clonală dintre neuroni din coloane corticale diferite, chiar îndepărtate. Walsh. C, Cepko, C.L. (1993) ***Clonal dispersion în proliferative layers of developing cerebral cortex.*** **Nature 362, 632 – 635 Watt, F.M., Hogan, B.L.M. (2000)** ***Out of*** *Eden: Stern cells* ***and their*** *niches.*

Science 287, 1427 – 1430 Watterson, **R.**L., Fowler, **I. (1953)** *Regulative development în lateral halves of chick neural tubes.* Anat. Record 117, 773 – 804 Wagner, J.P. Black, I.B., DiCicco-Blum, E. (1999). *Stimulation of neonatal and adult brain neurogenesis by subcutaneous injection of basic fibroblast growth factor.* J. Neurosci. 19, 6006 – 6016 Weiss, S., Reynolds, B.A., Vescovi, A.L., Morshead, C, Craig, C.M., van der

Kooy, D. (1996). *îs there a neural stern cell in the mammalian forebrain?*

Trends. Neurosci. 19, 387 – 393

205

Wichterle, H., García-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. (1997). *Direct evidence for homotipic, glia-independent neuronal migration.* Neuron 18, 779 – 791 Este descrisă migrarea tangenţială a neuroblaştilor din reţeaua migratoei rostrală spre bulbul olfactiv de la rozătoare.

Wiesel, T.N. (1981) *The postnatal development of the visual cortex and the influence ofenvironment.* Physiol. Med. (Prelegere Nobel)

Wilson, D.B. (1973) *Chronological changes in the cell cycle, of chick neuroepithelial cells.* J. Embryol. Exp. Morphol. 29, 745 – 751

Wood, J.G., Martin, S., Price, D.J. (1992) *Evidence that the earliest generated cells of the murine cerebral cortex farm a transient*

population in the subplate and marginal zone. Dev. Brain Res. 66, 137 – 141

Woo, T.U., Beale, J.M., Finlay, B.L. (1991) *Dual fate of subplate neurons în a rodent.* Cerebral Cortex 1, 433 – 443

Wurmser, A.E., Gage, F.H. (2002) *Cell fusion causes confusion.* Nature 416, 485 – 486".

O scurtă discuţie asupra posibilităţii dediferenţierii.

„Yandava, B.D., Billinghurst, L.L., Snyder, E.Y. (1999) *„Global" cell, replacement isfeasible via neural stern cell transplantation: Evidencefrom the dysmyelinated shiverer mouse brain.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 7029 – 7034

Snyder şi colaboratorii demonstrează că potenţialul terapiei celulare în sistemul nervos central adult este mult mai mare decât se aprecia, astfel că celulele suşe injectate se diferenţiază în oligodendrocite funcţionale, care recuperează deficitul morfologic şi comportamental datorat mielinizării incomplete la fenotipul *shiverer.*

Yang, H., Multaba, T., Venkatraman, G., Wu, Y.Y., Rao, M.S., Luskin, M.B. (2000) *Region-specific differentiation of neural tubederived neuronal restricted progenitor cells after heterotopic transplantation.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 13366 – 13371

Zhang: J.H., Cerretti, D.P., Yu, T., Flanagan, J.G., Zhou, R. (1996) *Detection of ligands în regions anatomically connected to neurons expressing the eph receptor Bsk: potenţial roles în neuron-îarget interaction.* J. Neurosci. 16, 7182 – 7192

Zuckerman, M. (1991) *Psychobiology ofpersonality.* Cambridge University Press, Cambridge

Capitolul **4**

SINAPTOGENEZA. FORMAREA REŢELELOR NEURONALE ŞI A CIRCUITELOR NERVOASE

CONŢINUTUL CAPITOLULUI:

Densitatea sinaptică în diferite sisteme corticale.
Unele diferenţe morfo-funcţionale între sinapse
Selecţia activă a sinapselor
Dezvoltarea şi asamblarea sinapsei
Joncţiunile de tranzit (gap) şi activitatea electrică spontană
Mecanisme moleculare ale dezvoltării şi formării sinapsei
„Lanţul slăbiciunilor": de la comportament la sinapsă şi genom

Rezumat

Creierul este compus din circa 100 de miliarde de neuroni care se estimează că sunt conectaţi prin circa 1.000 de sinapse/neuron (Kandel, Schwarz & Jessell, 1991). Este foarte important să înţelegem semnalele care mediază formarea acestor reţele neuronale întrucât este puţin probabil, actualmente, să mai credem că există gene care controlează direct „cablarea" specifică a neuronilor.

În acest capitol, vom urmări neuronii care îşi extind procese ce pot răspunde la semnale atractante sau repulsive, cum ar fi unii factori solubili sau molecule membranare, astfel încât să stabilească conexiuni tipice. De selectivitatea cu care neuroblastu! răspunde la aceste semnale depinde specificitatea conexiunilor sale. Cum răspunsul selectiv al celulei este dependent mai ales de receptorii cu care aceasta este echipată, formarea reţelelor şi circuitelor nervoase ne va provoca la o nouă excursie până la nivel molecular. Cu alte cuvinte, va trebui să descriem cu ce „bagaje" se pregăteşte neuroblastul şi semnalele după care îşi alege traseul şi destinaţia. Vom discuta toate aceste lucruri în jurul temei cardinale, formarea sinapselor său. sinaptogeneză. Două lecţii aşteaptă să fie instrumentate: sinapsa este, înainte de toate, o structură funcţională plastică, atât de plastică încât cele mai multe teorii ale învăţării se focalizează pe modelarea sinaptică; un corolar al acestei prime teze este că plasticitatea sinapsei se bazează pe comunicarea directă dintre comportament, sinapsă şi gene (Kandel, 2000). Nicăieri nu este mai evident că genomul nu este un program, ci o bază de date care se reactualizează în funcţie de starea sistemului celular.

Sinapsa este regiunea de contact dintre doi neuroni sau dintre un neuron şi o celulă efectoare prin care cele două celule „comunică", adică îşi influenţează reciproc starea trofică şi funcţională. Termenul „sinapsă", derivat din grecescul „a cuprinde", a fost introdus încă din 1897 de C. Sherrington, dar existenţa unor asemenea contacte intercelulare a fost dezbătută încă mult timp după aceea de histologi. De fapt, consacrarea sinapsei ca termen care descrie o porţiune de contact identificabilă morfologic şi relevantă funcţional rezumă două dintre cele mai importante controverse din neuroştiinţe: teoria neuronului şi teoria comunicării

chimice a sinapsei. Cu alte cuvinte, înainte de a vorbi de sinapse,

trebuie să vedem cum s-a ajuns să se dovedească faptul că sistemul nervos este compus într-adevăr din unităţi morfologice şi funcţionale distincte, numite neuroni şi trebuie să arătăm cum funcţionează aceste sinapse sau cum un neuron semnalizează altei celule un eveniment celular.

Fig. 4.1 ***Desenul lui S. Ramón y Cajal după o secţiune proprie făcută prin cortexul cerebelos (etichetare Golgi). În acest desen, inclus într-un articol publicat în 1888, se observă pentru prima dată neuronii (celule Purkinje, celule cu coşuleţ, celule granulare) cu toate prelungirile dendritice şi axonale.*** **(Redesenat după Ramón y Cajal, 1888)**

La sfârşitul secolului XIX, o teorie foarte influentă asupra structurii sistemului nervos susţinea că acesta este compus dintr-o reţea continuă de fibre nervoase. Acestei teorii reticulare a sistemului nervos îi erau opuse argumentele, mai ales morfologice, care indicau prezenţa unor celule conectate prin procesele lor lungi. Deci teoria neuronului susţinea că sistemul nervos este compus din unităţi structurale şi funcţionale distincte, aflate în relaţii de contiguitate, nu de continuitate (Ramón y Cajal, 1934). La vremea aceea, era mai uşor de acceptat că funcţia sistemului nervos este susţinută de o reţea continuă, unitară, decât de o colecţie de unităţi morfologic distincte1. În prima jumătate a secolului XX, dovezile în sprijinul teoriei neuronului, obţinute mai ales prin aplicarea metodei Golgi (Ramón y Cajal, 1906, 1911; Fig. **4.1) şi din observaţii asupra regenerării nervilor (Marinescu, 1895, 1909) sunt recunoscute, fapt confirmat şi de acordarea în 1906** a **premiului Nobel pentru Fiziologie şi Medicină lui S. Ramón y Cajal şi C. Golgi. Datele morfologice oferite prin metoda Golgi au fost întărite de** studii electronmicroscopice prin **care** sinapsa **a** fost descrisă ca şi zona de contact specializată dintre membrana presinaptică şi postsinaptică, despărţite de fanta sinaptică (Palade & Palay, 1954; DeRobertis & Bennett, 1954; Palay, 1956, 1958; vezi şi: **Caseta** 3. A).

Cajal rezumă foarte bine spiritul din acea perioadă: „E adevărat, ar fi foarte convenabil şi foarte economic din punctul de vedere al efortului analitic dacă toate centrele nervoase ar fi compuse dintr-o reţea intermediară continuă între nervii motori şi cei senzitivi şi senzoriali. Din păcate, naturii pare să îi fie străină nevoia noastră

intelectuală de comoditate şi unitate şi, foarte des, se bucură de complicaţie şi diversitate". (Ramón y Cajal, 1906, pp. 240)

208

Caseta 4. A STRUCTURA SINAPSEI

O sinapsă este locul de contact dintre un terminal presinaptic şi o celulă ţintă, despărţite de o fantă sinaptică. Terminalul presinaptic este un segment al neuronului sub formă de buton, cu diametru de – O.5 – 2 um, ce conţine organite celulare, dintre care cele mai numeroase sunt mitocondriile. În celula postsinaptică, la nivelul zonei de contact sinaptic, cele mai numeroase organite sunt reprezentate de reticulul endoplasmatic şi microfilamente (Palade & Palay, 1954; **Fig.** 3.2).

Membrana presinaptică prezintă zone mai dense electronmicroscopic, numite zone active, în dreptul cărora se aglomerează veziculele cu neurotransmiţător (pentru detalii, vezi: Olteanu & Lupu, 2000, pp. 175 – 79). Veziculele cu neurotransmiţător u, de obicei, diametrul de 30 – 60 µm şi onţin pachete cu neurotransmiţător de – 5.000 de molecule, numite cuante, dată cu propagarea potenţialului deţiune până în zona terminalului esinaptic, se produce un influx rapid calciu care declanşează exocitoza neurotransmiţătorului, fapt susţinutntru prima dată de J. Del Castillo şi B. Katz (vezi: Katz, 1970). Fuziunea eziculelor şi eliberarea eurotransmiţătorului reclamă o serie de proteine, numite proteine asociate veziculelor cu neurotransmiţător: sinaptotagmina, senzorul ionilor de ilciu, sinapsinele, cu rol în decuplarea veziculelor de pe citoscheletul local şi Isinaptobrevina şi sinaptofizina, implicate în formarea unor canale nice necesare pentru exocitoza. Şi membrana postsinaptică are o zonă electronmicroscopic densă, care este numită densitate postsinaptică şi reprezintă regiunea în care se găsesc receptorii postsinaptici. În funcţie de natura componentei postsinaptice, sinapsele pot fi axosomatice, axodendritice sau axoaxonice, între terminaţia axonală a unui neuron şi corpul celular, dendrita, respectiv, axonul unei celule postsinaptice sau dendrodendritice, între dendritele celulelor presinaptică şi postsinaptică. Cele mai multe sinapse axodendritice (asimetrice) sunt contactate pe formaţiuni (postsinaptice) în formă de buton, identificabile chiar la microscopul optic, care se numesc spini dendritici. Sinapsele axodendritice se pot realiza însă şi direct pe

trunchiul sau ramurile dendritice (sinapse simetrice) (Akert & colab., 1972; Uchizono, 1965).

În anii '50, E.G. Gray a clasificat sinapsele pe baza grosimii densităţii postsinaptice faţă de zona activă. Astfel, au fost descrise sinapse de tip I, care ştim astăzi că sunt reprezentate mai ales de sinapsele asimetrice, care au o densitate postsinaptică semnificativ mai groasă decât zona activă. La sinapsele de tip II, mai ales sinapse simetrice, densitatea postsinaptică şi zona activă au aproximativ aceeaşi grosime (Gray, 1959). Ulterior, dat fiind că sinapsele de pe spinii dendritici sunt de cele mai multe ori excitatorii, adică dispun de un neurotransmiţător excitator (de pildă, glutamatul), de receptori postsinaptici corespunzători şi mediază un răspuns excitator, s-a considerat că sinapsele de

tip I ar fi excitatorii, iar cele de tip II, inhibitorii (vezi, de ex.: Andersen, Eccles & Loyning, 1964 a, b). Sinapsele simetrice de tip II sunt, de obicei, inhibitorii, dispunând, de pildă, în izocortex, mai ales de neurotransmiţători inhibitori cum ar fi acidul y-aminobutiric (GABA); dar există şi excepţii, ca, de exemplu, sinapsele colinergice care nu sunt întotdeauna simetrice, ele putându-se realiza şi pe spini dendritici. Sigur, un criteriu ultrastructural după care pot fi clasificate sinapsele este reprezentat de forma şi transparenţa veziculelor cu neurotransmiţător: terminalul postsinaptic al unei sinapse excitatorii are vezicule de cele mai multe ori sferice şi clare, în timp ce sinapsele inhibitorii au în zona activă vezicule mai frecvent elipsoidale şi mai opace (Uchizono, 1965).

Referinţe bibliografice:

Akert, K., Pfenninger, K., Sandri, C, Moor, H. (1972) Freeze etching and cytochemistry of vesicles and membrane complexes în synapses of the central nervous sistem. În: Pappas.

G. D., Purpura, D.P. (Eds.): *Structura and function of synapses.* Raven, Newl

York

Andersen, P., Eccles, J. C, Loyning, Y. j

(1964 a) *Location of postsynaptk!*

Inhibitory synapses on hippocampal pyramids. J. Neurophysiol. 27, 592 – 607 I

Andersen, P., Eccles, J. C, Loyning, Y.

(1964 b) *Pathway of postsynaptk inhibition in the hippocampus.* J.
Neurophysiol. 27, 608 – 619
Gray, E.G. (1959) *Axo-somatic and axodendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study.* J. I
Anat. 93, 420 – 433
Katz, B. (1970) *On the quantal!*
mechanism of neural transmitter J
release. Physiol. Med. (Prelegere j
Nobel), 486 – 492
Olteanu, A., Lupu, V. (2000)
Neurofiziologia sistemelor senzitivosenzoriale. Presa Universitară Clujeană.
Cluj-Napoca
Palade, G.E., Palay, S.L. (1954)
Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses. Anat… Rec. 118, 335 – 336 i

Se pare că, dacă neuroanatomiştii s-au îndoit de existenţa unor contacte specializate între neuroni, neurofiziologii au avut argumente pentru a fi mai convinşi de această observaţie. Oricum, au existat şi aici dezbateri privind natura semnalizării prin intermediul acestor conexiuni. La început, s-a crezut că nervul influenţează organul efector prin transmiterea directă a impulsului electric la acesta din urmă. Fenomenul conducerii impulsului nervos apărea ca un fenomen fizico-chimic neîntrerupt, cu o întârziere neglijabilă la nivelul contactului dintre nerv şi efector. C. Sherrington aduce primele argumente fiziologice de care avea nevoie teoria structurală a neuronului. El arată că sinapsele mediază atât specificitatea activităţii sistemului nervos, prin faptul că un grup de neuroni îşi modifică activitatea în funcţie de stimularea presinaptică, cât şi componenta integrativă, prin efecte cum ar fi inhibiţia sau facilitarea (vezi: Sherrington, 1906). Experimentele lui H.H. Dale şi O. Loewi au demonstrat apoi că semnalizarea intercelulară

mediată de sinapsă este de natură chimică. Loewi, de pildă, a indicat prin experimente efectuate pe nervul vag, care inervează inima broaştei, că o substanţă chimică pe care a numit-o iniţial „substanţa vagului" *(Vagustoff)* este necesară pentru apariţia unui răspuns al

efectorului (Loewi, 1921). Semnalizarea sinaptică mediată de această substanţă care s-a dovedit a fi acetilcolina, recunoscută astăzi ca „heurotransmiţător", este inhibată prin administrarea unor antagonişti specifici, de pildă, atropină. Loewi a susţinut iniţial că doar sinapsele din sistemul nervos periferic (SNP) au acest mecanism de „transfer chimic" pentru că, testat în cazul sinapselor din sistemul nervos central (SNC), acesta este foarte lent şi, astfel, puţin probabil ca substrat funcţional (Loewi, 1936). Însă Dale şi alţii au confirmat validitatea acestui mecanism chimic şi în cazul sinapselor centrale demonstrând validitatea funcţională a teoriei neuronului şi, implicit, a sinapsei (vezi: Dale, 1936; Katz, 1970; Eccles, 1982). Sigur, în SNC, în afară de sinapse de tip chimic, există şi sinapse electrice care, aşa cum vom vedea, par să premeargă uneori primului tip de sinapsă în dezvoltarea sistemului nervos.

buton sinaptic proteine fii am ento a se microtubuli mito con cir îi vezicule inaptice membrana presinaptică fanta sinaptică membrana postanaptică

Fig. 4.2 *Ultrastructura sinapsei* (Modificat după Olteanu & Lupu, 2000)

Sinapsa este considerată astăzi ca şi cheie a funcţiei de semnalizare a sistemului nervos. Comunicarea sinaptică este unul din cele mai plastice procese a cărei modulare este pusă, în general, la baza învăţării şi memoriei (vezi, de pildă: Jessell & Kandel, 1993). Astfel, s-ar putea ca explicarea formării şi stabilizării sinapselor, proces la care ne vom referi ca sinaptogeneză, să fie informativă pentru învăţare. Din această perspectivă, învăţarea ar putea fi susţinută de modelarea „comportamentală" a sinapselor. Sau am putea spune că sinapsele sunt considerate drept cele mai „comportamentale" segmente ale neuronului. Oricum, conexiunile dintre neuroni reprezintă o matrice care se dezvoltă şi funcţionează pe baza modelării declanşate de experienţă sau comportament. Dezvoltarea şi învăţarea ilustrează selectivitatea creşterii şi funcţionării sistemului nervos şi este lecţia în care neurobiologia dezvoltării îşi demonstrează rafinamentul metodologic şi teoretic.

211

4.1 Densitatea **sinaptică** în diferite sisteme corticale

Una din concepţiile foarte des menţionate asupra dezvoltării sistemului nervos central postulează că maturarea structurală şi

funcţională a creierului se face ierarhic, de la structurile subcorticale spre cortex. O teză complementară susţine că, dintre ariile izocorticale, primele se maturează cele senzitivo-senzoriale, apoi cele motorii şi, în final, cele de asociaţie. Această concepţie derivă din observaţiile lui P. Flechsig, care a remarcat că, în creierul nou-născuţilor umani, substanţa albă din lobii parieto-temporal şi frontal are o afinitate mai redusă pentru markeri ai mielinei, în comparaţie cu cortexul vizual şi senzorio-motor (Flechsig, 1920). În acest caz, mielina este considerată un indicator al competenţei funcţionale a unui sistem cortical, premisă care nu este întotdeauna corectă. Astfel, sistemele izocorticale care la copil includ mai puţine fibre mielinizate au mai puţină substanţă albă şi în creierul adult; numai spre un exemplu, sulcusul principal din lobul prefrontal este foarte puţin mielinizat la primatele adulte (Preuss & Goldman-Rakic, 1991). Modelul ierarhic al maturării nu este nici el valabil în toate cazurile: de pildă, tractul piramidal sau sistemul cortico-spinal care proiectează de la nivelul cortexului motor către măduva spinării este mielinizat ultimul, deşi este un tract subcortical (vezi: Minkowski, 1967, pp. 3 – 70). Ideea dezvoltării sincrone a izocortexului capătă tot mai mult suport experimental, favorizând conceperea comportamentului ca rezultantă a integrării funcţiilor creierului, respectiv, activării unor diverse arii corticale şi structuri subcorticale relaţionate prin circuite nervoase. Chiar şi abordarea sinaptogenezei ne prilejuieşte să accentuăm că modelele ierarhice ale funcţionării sistemului nervos şi localizaţionismul sunt pe cale de dispariţie, concepţii simpliste specifice perioadelor paradigmatice ale oricărei ştiinţe.

Am notat deja o primă premisă: sinaptogeneza este aproximativ sincronizată în toate sistemele izocorticale. Ea se produce exclusiv postnatal. Deşi unele abordări iau numărul de sinapse ca un indicator al complexităţii funcţionale a unei structuri nervoase, mai multe sinapse nu înseamnă întotdeauna o funcţie mai sofisticată (B. L. Finlay, comunicare personală). Sindromul morţii infantile spontane (SIDS, *sudden infant death syndrome)* este asociat cu persistenţa unei populaţii supranumeroase de sinapse la nivelul bulbului rahidian (O'Kusky & Norman, 1995). Cele mai multe studii în care a fost înregistrată evoluţia sinaptogenezei în diferite arii izocorticale la primate[2] au fost efectuate de echipa lui P. Rakic.

În cazul izocortexului vizual primar, J.P. Bourgeois şi P. Rakic

(1993 a) au reconstituit evoluţia sinaptogenezei prin suprapunerea unor imagini elecâronmicroscopice seriale. Aceste cercetări au indicat că primele sinapse apar în subplacă şi în zona marginală (E 50). Sinapse se formează apoi în placa corticală.

Ne referim la macaci *(Maccacus rhessus),* o specie de primată pe care au fost efectuate majoritatea cercetărilor asupra sinaptogenezei de către echipa lui P. Rakic, rezultate pe care le prezentăm parţial în continuare.

212

Începând din stratul IV (E 65-E 89), pentru ca, după formarea tuturor straturilor corticale (-E 112), sinapsele să fie distribuite în toată placa corticală, fiind predominante sinapsele contactate de neuronii corticali pe arborizaţia dendritâcă. Până în a treia lună postnatal, densitatea sinapselor creşte exponenţial astfel că ajunge la 90 de sinapse/100 um**3** de ţesut cortical; această densitate în următorii doi ani de viaţă postnatală scade până la 80 de sinapse/100 om de ţesut cortical şi, în perioada pubertăţii, scade şi mai mult, până la 40 – 50 de sinapse/100 um**J**. Se estimează că această reducere a densităţii sinaptice cu – 40% în cortexul vizual primar presupune pierderea a – 5.000 de sinapse/se în cele două emisfere (Bourgeois & Rakic., 1993 b).

În izocortexul somato-senzitiv al primatelor, densitatea sinaptică creşte aproape linear pe parcursul perioadei fetale târzii şi în viaţa postnatală timpurie. Iniţial, se înregistrează o supraproducţie de 70 de sinapse/100 um**3** de ţesut cortical până în cea de-a doua lună postnatal. Această densitate scade până în al treilea an de viaţă postnatal până la 60 de sinapse şi, în perioada pubertăţii, până la 30 – 40 de sinapse/100 um**3** (Zecevic & Rakic, 1991). Atât în cazul izocortexului vizual, cât şi în al celui somato-senzitiv, selecţia sinapselor se consideră că reflectă maturarea funcţională şi plasticitatea postnatală a acestor a sisteme izocorticaile (Rakic & colab., 1986).

Alte studii au investigat densitatea sinaptică în cortexul prefrontal şi au; descris mai multe faze. În prima fază, numită precorticală (E 47 – E 78), sinapsele pot fi identificate deasupra şi dedesubtul, dar nu şi în placa corticală. Între zilele embrionare E 78 şi. E 104, sinapsele încep să apară în placa corticală (faza corticală), această perioadă fiind urmată de o supraproducţie de sinapse care

începe cu două luni înainte de naştere şi continuă aproximativ două luni postnatal, densitatea medie de sinapse fiind de 750 de milioane de sinapse/um3. Această densitate extraordinară se păstrează până la aproximativ trei ani, pentru ca după această vârstă până la aproximativ 20 de ani, numărul sinapselor să scadă semnificativ (Bourgeois, Goldman-Rakic & Rakic, 1994).

În general, se poate afirma că numărul sinapselor creşte rapid într-o primă perioadă, urmează o perioadă de platou şi una de selecţie a sinapselor. Acest model este susţinut de date experimentale în aproape toate zonele corticale majore: cortex vizual, somato-senzitiv, frontal şi cingulat. Faptul că densitatea sinaptică este relativ stabilă în perioada pubertăţii ar fi informativ pentru explicarea rolului redundanţei sinaptice funcţionale în timpul perioadei când învăţarea sculptează creierul şi rafinează circuitele nervoase (Rakic & colab., 1986).

Datele despre sinaptogeneza la oameni diferă aparent de cele obţinute la primate. P.R. Huttenlocher şi colaboratorii au indicat că cortexurile vizual şi auditiv înregistrează vârful sinaptogenezei. mai devreme decât cortexul frontal (Huttenlocher, 1979; Huttenlocher & Dabholkar, 1997). La primate, densitatea sinaptică maximă se înregistrează la două până la patru luni după naştere, în timp ce la om, sinaptogeneza este accelerată după naştere, iar curba se aplatizează postnatal în toate ariile corticale (Fig. 4.3). Studii publicate mai recent sugerează că nu diferenţa dintre maximul sinaptogenezei descris în cele două seturi de date este

relevantă, ci sincronizarea perioadelor de accelerare şi decelerare a sinaptogenezei la primate şi la om. În plus, metodele folosite în aceste studii produc estimări cu o variabilitate prea mare (pentru o discuţie, vezi: Bates & colab., 2001). Variabilitatea sinaptogenezei se înregistrează şi între celule din acelaşi sistem cortical; spre un exemplu, celulele stelate din zona profundă a stratului IV la primate realizează sinapse după o funcţie nonliniară, la diferenţă de circa 4 săptămâni de cele din alte straturi ale cortexului vizual (Lund & Holbach, 1990). În plus, studiul lui Huttenlocher nu oferă date care să acopere într-un chip semnificativ şi omogen perioada de evoluţie a sinaptogenezei discutată. Studiul a investigat 21 de exemplare de creier uman pentru care oferă date numai pentru stratul

III al girusului frontal median, creiere prelevate postmortem de la subiecți cu vârste între o și 91 de ani, lipsind însă mostre de țesut corespunzătoare perioadei de la 1 la 5, respectiv, 8 la 15 ani. Chiar Huttenlocher (1990) incriminează explicit aceste lipsuri de eșantionare.

Smaptogeneza la macac

2 Î0%

230% – **Sinaptogeneta la om** cortex vizual. cortex motor cortex somato-senzitiv

100%

100%

1.000 1.500 – **125**

Zile după concepție

Fig. 4.3 *Sinaptogeneza la macac (112 zile după concepție-pubertate) și la om (192 zile după concepție-pubertate). La macaci, cea mai mare densitatea sinoptică este maximă la patru luni după naștere. La om, Cuba sinaptogenezei este asemănătoare, desnitatea sinoptică crescând postnatal și scăzând apoi progresiv până la pubertate, în toate ariile corticale.* (Modificat după Bates & colab., 2001)

Care este mecanismul care determină această evoluție a sinaptogenezei? Interpretarea lui P. Rakic și a colaboratorilor este că: „[...] dacă experiența modifică numărul de sinapse în timpul dezvoltării, acest lucru se întâmplă prin supraviețuirea selectivă a anumitor sinapse, nu prin reglarea formării lor inițiale". (Rakic & colab., 1986, pp. 234) Totuși, ce declanșează aceste schimbări majore ale densității sinaptice? Accelerarea perinatală a sinaptogenezei corelează cu intervenția activității neuronale evocate de stimuli. S-a presupus că schimbări nervoase structurale intervin în chip sistematic în funcție de mediul de viață al animalului. F. Valverde arată că, în cazul șoarecilor deprivați vizual imediat după naștere, arborizația dendritică și numărul de spini dendritici sunt semnificativ mai

reduse, implicit, și numărul de sinapse contactate de celulele stelate și celulele piramidale din cortexul vizual primar (Valverde, 1967, 1968). Aceste modificări par să fie reversibile pentru că, la animale deprivate vizual timp de doar 20 de zile după naștere, perioadă după care deprivarea încetează, schimbările structurale

identificate dispar, iar sinaptogeneză în cortexul vizual primar se normalizează (Valverde, 1971). Ca să menţionăm numai un alt exemplu, echipa lui W.T. Greenough a indicat că sarcinile de învăţare motorie se asociază cu sinaptogeneză în cortexul motor (Black & colab., 1990). Aceste sarcini de învăţare trebuie interpretate ca şi componente ale unui mediu stimulativ, ele solicitând mai mult decât o simplă activitate neuronală. Ca dovadă, animalele care au avut de efectuat sarcini motorii simple (de exemplu, alergarea pe o bandă) nu au înregistrat o sinaptogeneză marcată, ci doar formarea de noi capilare care să poată susţine activitatea metabolică neuronală suplimentată (Fig. 4.4; pentru detalii, vezi: Greenough, Black & Wallace, 1996; Miu, 2001).

Experimentele mai recente ale lui Rakic susţin că experienţa este importantă pentru sinaptogeneză, dar nu poate explica supraproducţia postnatală de sinapse. La primatele deprivate de stimuli vizuali imediat după naştere, accelerarea iniţială a sinaptogenezei nu s-a modificat, existând diferenţe periferice în ceea ce priveşte distribuţia laminară a sinapselor şi evoluţia generală a sinaptogenezei (Bourgeois & Rakic, 1996; pentru rezultate similare la pisici, vezi: O'Kusky, 1985).

Chiar şi când este produsă naşterea prematură cu aproximativ trei luni înainte de termen, pentru a controla mai bine intervenţia experienţei vizuale, sinaptogeneză se desfăşoară după programul normal, raportat la momentul naşterii premature. Acest fapt sugerează că experienţa nu cauzează explozia sinaptogenezei, dar evoluţia a sincronizat accelerarea sinaptogenezei cu momentul naşterii. O posibilă interpretare oferită de B.L. Finlay şi colaboratorii este că, prin oferirea unei rezerve de sinapse la momentul intervenţiei experienţei, creierul se pregăteşte atât pentru oportunităţi de învăţare previzibile, cât şi imprevizibile (Bates & colab, 2001). Simularea în reţele artificiale (neuromimetice) adaptative, care presupun supraproducţia şi reducerea succesivă a conexiunilor, a indicat că informaţia este conservată mai bine şi permite transformarea mai rapidă a datelor complexe, faţă de reţelele neadaptative (Adelsberger-Mangan & Levy, 1994; pentru detalii, vezi: Elman & colab., 1996). În fond, teza este de simţ comun: dacă nu ai un proiect în care toate secvenţele să fie specificate detaliat, e mai sigur că vei reuşi să modelezi corect o piesă dacă foloseşti de la început o bucată mai mare de material!

Rezumativ, sinaptogeneză poate fi împărţită în cinci faze (Bourgeois.

1997). În faza iniţială, sinaptogeneză este limitată în preplacă şi, apoi, în subplacă şi zona marginală (viitor strat cortical I; vezi: capitolul anterior). În a doua fază, sinapsele apar în placa corticală, urmând ca în faza a treia să se accelereze producţia de sinapse care se estimează că ajunge, în perioada când sinaptogeneză

I atinge maximul la puiul de primată, la circa 40 de mii de sinapse pe secundă. Faza

I a patra înregistrează un platou al sinaptogenezei, sinapsele fiind produse la un nivel

215

ridicat relativ constant. Declinul densităţii sinaptice se extinde de la pubertate până în perioada adultă. Am notat că această evoluţie este reprezentativă pentru toate sistemele corticale majore.

”).;”: „: „i-iSv1. –).”;”:

A” ...!...

?. O ...:

— I

r

...;]

100 90 – 80 – 70

50 – 40 – 30 – 20 – 10

y

— CONTROL – A – ALERGARE

...– * – ÎNOT

12 345 6 78

ZIUA

Fig. 4.4 *Performanţele la condiţionarea de evitare ale şobolanilor din medii de viaţă standard şi medii îmbogăţite. Ilustrarea unor condiţii standard () şi condiţii mai ecologice (a) în care pot fi ţinute animalele experimentale. Graficul din partea de jos reprezintă performanţele la condiţionarea de evitare activă a şobolanilor care au avut posibilităţi exploratorii (alergare pe bandă, înot) faţă de control.* (A, B, modificate după Calder, 1970; Graficul este modificat după Olteanu & colab., 2001 şi Miu, 2001)

Odată cu modificarea densităţii sinaptice, sunt produşi şi

receptorii postsinaptici, evoluţia acestui eveniment fiind perfect sincronizată cu evoluţia sinaptogenezei. Un studiu al echipei lui P. Rakic a investigat numărul de receptori şi afinitatea acestora în diferite regiuni ale izocortexului. Se pare că, în primele două luni de viaţă postnatală, densitatea receptorilor a crescut la un nivel aproape dublu faţă de adult, urmând, între 2 şi 4 luni, o perioadă de platou şi un declin

prelungit până la pubertate. Această descriere a evoluţiei densităţii receptorilor s-a verificat în cazul cortexurilor vizual şi motor primare, somato-senzitiv şi ariilor prefrontale. Mai mult, ea s-a confirmat şi în cazul tuturor straturilor din aceste zone, în care are loc supraproducţia sincronă de receptori şi, apoi, reducerea numărului acestora (Lidow, Glodman-Rakic & Rakic, 1991; vezi şi: Cottrell *&:* colab., 2000). Un receptor care face excepţie de ia acest program este receptorul *N*-metil-D-aspartat (NMDA), un subtip de receptor glutamatergic (pentru detalii, vezi: Cotman & colab., 1987). Acesta este produs înainte de fazele iniţiale ale sinaptogenezei (Zecevic & Milosević, 1997; Aoki, 1997). Vom reveni asupra acestor cercetări atunci când vom discuta formarea sinapsei pentru că receptorul NMDA pare să aibă un rol important în acest proces.

În cazul receptorilor investigaţi (acetilcolinici, GABA-ergici, dopaminergici), afinitatea acestora nu s-a modificat semnificativ în timpul sinaptogenezei, cu toate că rata de sinteză a neurotransmiţătorilor corespunzători are un program diferenţiat temporal (Lidow, Giodman-Rakic & Rakic, 1991; Lidow & Rakic, 1995). Acest program al sintezei neurotransmiţătorilor este diferenţiat şi spaţial, unii fiind sintetizaţi în structuri nervoase subcorticale, iar unii chiar în cortex. Ceea ce putem spune este că sinteza şi distribuţia acestor neurotransmiţători se schimbă în timpul maturării corticale, ceea ce poate indica faptul că acestea sunt procese relevante pentru dezvoltarea nervoasă (Goldman-Rakic & Brown, 1982).

Unele studii au indicat variaţii morfologice ale sinapselor produse în perioada de sinaptogeneză intensă, ceea ce pare să sugereze că evoluţia acestui proces presupune mai mult decât modificarea densităţii sinaptice. Aceasta corectează o premisă destul de des invocată, aceea că „Mai mult înseamnă mai bun” (Turner & Greenough, 1985). Creşterea densităţii sinaptice nu poate constitui ea

singură un indicator al complexităţii funcţionale a sistemelor corticale. Nu toate sinapsele sunt la fel. Prin urmare, pentru a integra mai mulţi parametri ai complexităţii funcţionale, vom trata în continuare unele din variabilele morfologico-funcţionale ale sinapselor.

4.2 Unele diferenţe morfo-funcţionale între sinapse

S-au descris două tipuri de sinapse: sinapse simetrice, pe trunchiul şi ramurile dendritelor şi sinapse asimetrice, pe spinii sinaptici. De ce este relevantă această observaţie morfologică? Pentru că sinapsele asimetrice e mai probabii să fie excitatorii, iar cele simetrice, inhibitorii **(Fig.** 4.5). În timpul fazei a treia a sinaptogenezei, atunci când se înregistrează o supraproducţie de sinapse în toate ariile corticale, numărul sinapselor asimetrice scade, deşi acestea predomină înainte

de acest moment, iar numărul sinapselor simetrice rămâne constant (Bourgeois & Rakic, 1993 b; Zecevic & Rakic, 1991). Acest proces sugerează reglarea activării corticale excitatorii faţă de cea inhibitorie, ceea ce poate fi corelat cu mecanisme subiacente învăţării perceptiv-motrice.

217

Curba sinaptică este un aspect morfologic variabil, care este considerat relevant din punct de vedere funcţional (Markus & Petit, 1989). De pildă, una din teorii susţine că într-un neuron foarte activ, veziculele cu neurotransmiţător sunt mai numeroase, iar membrana presinaptică pătrunde înspre cea postsinaptică pentru a facilita inserţia veziculelor şi eliberarea neurotransmiţătorului în timpul activităţii sinaptice marcate (Marrone & Petit, 2002). Curba sinaptică este un termen generic pentru aspectul morfologic al zonelor de contact dintre două celule care fac sinapsă. Astfel, există sinapse concave, la care terminalul presinaptic deformează concav membrana postsinaptică. O sinapsă convexă este aceea la care elementul postsinaptic deformează concav terminalul presinaptic. Există şi sinapse neregulate la care, de obicei, se observă mai mult de o curbă, cum ar fi cele la care» membranele pre- şi postsinaptică sunt modelate sub forma literei „S" (pentru detalii, vezi: Weeks & colab., 1999, 2000, 2001).

densităţi postânaptice

RE *TEPEZ*

Fig. 3.3 *Tipuri de sinapse colinergice în hipocamp. Se observă*

zonele active cu veziculele cu neurotransmiţător, densităţile postsinaptice, mitocondriile (M), reticulul endoplasmatic (RE). A, sinapse simetrice pe trunchiul dendritic; B, sinapse asimetrice pe spinul dendritic; C, sinapse axosomatice; D, sinapsă simetrică pe partea laterală a unui spin dendritic care a format şi o sinapsă concavă. N, nucleu. (Modificat după Frotscher, 1989).

Mărimea elementelor sinaptice este şi ea variabilă. Mărirea zonei active, regiune mai îngroşată din membrana presinaptică în dreptul căreia sunt depozitate veziculele cu neurotransmiţător, respectiv, a densităţii postsinaptice, zona din membrana postsinaptică în care sunt aglomeraţi receptorii, este limitată la perioada de supraproducţie sinaptică. Odată cu finalul acesteia, s-a constatat că mărimea sinapselor scade până la nivelul descris pentru sinapsele adulte. Este interesant că mărirea sinapsei este asociată unor forme ale plasticităţii sinaptice (Desmond & Levy, 1988) care se consideră că ar fi corelatul celular al învăţării, o astfel de modificare sinaptică fiind potenţarea de lungă durată (LTP; pentru detalii, vezi: Kandel, 1979; Opere & Miu, 2001 şi mai jos). În principiu, o sinapsă mai mare înseamnă o sinapsă în care o cantitate mai mare de neurotransmiţător poate fi eliberată de la nivel presinaptic, cu o densitate postsinaptică cu mai mulţi receptori şi, în genere, sinapsele mai mari sunt mai eficiente: sunt mai plastice şi pot crea un semnal sinaptic mai intens (Petit, 1995). Însă, atât în cazul dezvoltării, unde dimensiunea sinapselor tinde să scadă după sfârşitul fazei a treia a sinaptogenezei, cât şi în cazul plasticităţii sinaptice adulte, unde sinapsele sunt mai mici, se remarcă tendinţa acestora ca, odată cu reducerea mărimii, ele să devină concave.

218

Există dovezi preliminare că reducerea sinapsei presupune îngustarea terminalului sinaptic, acest fapt fiind interpretat ca un mijloc de facilitare a compartimentalizării microdomeniilor calciului şi, consecutiv, creşterea probabilităţii de eliberare a neurotransmiţătorului (pentru detalii, vezi: Castro-Alamancos & Connors, 1997, dar şi: Olteanu, Lupu & Miu, 200Î, pp. 268 – 269). Deci, deşi sinapsele mai mici se presupune că dispun de o cantitate mai mică de neurotransmiţători (Mackenzie & colab., 1999), eficienţa lor este favorizată de optimizarea influxului de calciu şi a exocitării neurotransmiţătorului.

Studii electronrnicroscopile relativ recente au indicat o altă caracteristică morfologică şi funcţională a sinapselor, destul de puţin cunoscută. Aceste cercetări au relevat existenţa unor sinapse la care densitatea postsinaptică este perforată (Calverley & Jones, 1990). D.G. Jones şi R.K.S. Calverley au arătat că, dacă numărul sinapselor scade spre sfârşitul perioadei a treia de sinaptogeneză, numărul sinapselor perforate creşte. Sinapsele trec prin diferite morfologii (densitate postsinaptică în formă de gogoaşă, potcoavă, clopot) până să devină sinapse perforate (Jones & Calverley, 1991). În câmpul CAI din cornul lui Ammon, unul din straturile hipocampului, în perioada supraproducţiei sinapselor (P 15), există puţine sinapse perforate, dar numărul acestora creşte de până la de patru ori până la sfârşitul acestei perioade de dezvoltare (de la P 15 până în perioada adultă) (Sorra, Fiala & Harris, 1998; Harris, Jensen & Tsao, 1992).

4.3 Selecţia activă a sinapselor

Sinaptogeneză este un proces de selecţie activ. O filiaţie de argumente care susţine caracterul epigenetic al sinaptogenezei indică variabilitatea semnificativă a conexiunilor neuronale la indivizi cu aceleaşi prescripţii genetice (izogenici), cum ar fi gemenii univitelini. La unele nevertebrate, de pildă, numărul celulelor şi specificitatea conexiunilor sinaptice dintre celulele receptoare şi celulele ganglionare din retină sunt stereotipice la indivizi izogenici, dar se remarcă o variabilitate semnificativă a morfologiei axonilor şi a numărului de sinapse (Macagno, Lopresti & Levinthal, 1973; Levinthal, Macagrio & Levinthal, 1976). La mamifere, variază chiar şi numărul şi fenotipul neuronilor (de ex., tipul de neurotransmiţător sintetizat de către o populaţie de neuroni) din reţele neuronale echivalente din creierul unor astfel de indivizi izogenici (Hdkfelt & colab., 1986). Această variabilitate este un punct de start pentru a demonstra că sinaptogeneză nu este un proces predeterminat şi chiar că variabilitatea sinaptică pare să crească cu gradul de complexitate al reţelei neuronale (Changeux, 1983).

Pentru a aborda problema sinaptogenezei, trebuie să detaliem mai întâi creşterea neuronilor şi maturarea lor morfologică şi funcţională. Formarea reţelelor şi circuitelor neuronale presupune ca neuronii să îşi extindă procese de creştere care să aibă un traseu tipic determinat de răspunsul selectiv al celulei ia micromediul celular. Aceste procese de creştere au fost categorizate, pe baza morfologiei

lamelare sau sub forma unei prelungiri, în lamelopodii, respectiv, filopodii.

219

Primul factor care contribuie la yariabilitatea sinaptogenezei este variabilitatea topologică a creşterii neuronale (îl vom nota cu: /l). Aceasta depinde de locaţia celulei (/la), factori solubili prezenţi în micromediul celular (Ic) şi molecule asociate membranei celulelor cu care neuroblastul ia contact (/ld), toate aceste semnale influenţând celula numai dacă aceasta are receptori specifici (/lb). În timpul extinderii axonului, aceste procese de creştere formează contacte temporare determinate de specificitatea adezivă intercelulară. Adeziunea este homotipică, adică este specifică unor celule care exprimă aceleaşi molecule de adeziune. Un alt factor de variabilitate al sinaptogenezei este reprezentat de proprietăţile adezive ale celulelor adiacente neuroblastului *(fi),* cum ar fi alţi neuroni sau celule gliale. După ce îşi recunoaşte ţinta, procesul de creştere al neuroblastului se stabilizează şi capătă aspectul unui axon sau dendrită care formează sinapse cu celula devenită postsinaptică. Activitatea electrică întăreşte unele dintre aceste sinapse, în timp ce altele sunt eliminate. În cazul sinaptogenezei, este foarte bine ilustrată interacţiunea dintre mecanismele de creştere şi activitatea electrică spontană sau evocată *(fi).* Vom discuta pe rând aceste trei categorii de factori care descriu sinaptogeneza ca pe un proces de selecţie activ, contact –, chimicşi electric-dependent. Întrebările la care trebuie să răspundem sunt: cum îşi extind neuronii procese de creştere, cum sunt ghidaţi către ţinta tipică şi cum se formează sinapsele.

Înainte de a aborda aceste probleme, vom expune unul dintre modelele cele mai cunoscute ale sinaptogenezei propus de J.P. Changeux şi colaboratorii. Conform acestui model, o sinapsă stabilă este o sinapsă matură. Changeux consideră, cu temei experimental, că, în timpul unei perioade iniţiale, denumită perioadă sensibilă *(sensitive period),* neuronii fac sinapse supranumeroase, printr-un proces denumit expansiune *(prooning),* iar reţelele neuronale trec printr-o etapă definită de redundanţa sinaptică temporară (Changeux & Danchin, 1976). Activitatea endogenă sau evocată din reţelele neuronale în dezvoltare ar selecta activ aceste sinapse, lăsându-le numai pe cele necesare din punct de vedere funcţional. După această teorie, sinapsele există în trei stări: labilă, stabilă şi degenerativă.

Sinapsele sunt funcţionale numai în stările labilă şi stabilă. Sinapsele pot trece de la o stare la alta prin stabilizare, de la starea labilă la cea stabilă, prin regresiune, de la starea stabilă la cea degenerativă şi prin labilizare, de la starea stabilă la cea labilă (Changeux, Courrege & Danchin, 1973). Evoluţia fiecărei sinapse este controlată de numeroşi factori, majoritatea ţinând de celula postsinaptică. Astfel, se consideră că mai multe celule presinaptice (conuri de creştere) concurează pentru resurse limitate dependente de celula postsinaptică. Că I s-a luăm numai două exemple, conul de creştere poate concura pentru un număr limitat de receptori de la nivelul densităţii postsinap ice sau centru factori neurotrofici care influenţează retrograd celula presinaptică (Changeux & colab., 1981; Fraser, 1985). În ambele cazuri, celulele presinaptice sunt în competiţie pentru o componentă limitată care poate influenţa în manieră retrogradă stabilizarea terminalului presinaptic. Oricine poate remarca faptul că acest mecanism activitate-dependent este necostisitor genetic, fiind explicabilă evoluţia

complexităţii structurale şi funcţionale a reţelelor neuronale fără a se înregistra şi o diversificare semnificativă a genelor (pentru o sinteză, vezi: Changeux, 1985).

Această teorie a fost formalizată şi testată în reţele neuronale artificiale (neuromimetice; pentru detalii, vezi: Miclea, 1999, pp. 39 – 44). S-a arătat că o funcţie poate fi implementată de reţele neuronale cu organizări (configuraţii) diferite de neuroni (unităţi) şi conexiuni (Changeux, Courrege & Danchin, 1973). Acest fapt poate explica similaritatea funcţională în condiţiile variabilităţii sinaptice documentată la indivizi izogenici. Modelul este criticat pentru că ia în calcul numai influenţa activităţii neuronale, fie ea spontană sau evocată, lăsând la o parte factorii legaţi de contactul intercelular şi factorii chimici. Sigur, activitatea neuronală spontană are o importanţă deosebită în organizarea reţelelor neuronale, încă de la Hamburger (1970) acumulându-se dovezi că există activitate electrică şi chimică spontană în sistemul nervos embrionar şi fetal. Această activitate nervoasă spontană depinde, probabil, de adevărate „oscilatoare moleculare" reprezentate de canale ionice rapide şi lente (Berridge & Rapp, 1979).

4.3.1 Teorii ale specificităţii sinaptice

Una din principalele probleme ale neurobiologiei dezvoltării este care ar fi mecanismul cu care se formează cu atâta precizie conexiunile neuronale. Apoi, ce mecanisme susţin sinaptogeneza? Iniţial, sinaptogeneza a fost explicată mecanicist, fiind considerată dependentă de factori temporali, ţinând de rata de creştere şi alinierea ultrastructurală a componentelor pre- şi postsinaptică (Weiss, 1939). Din anii '30 însă, au început să se acumuleze dovezi care indicau că specificitatea funcţională neuronală nu depinde de tipul de conexiune morfologică, ci de tipul de semnale pe care neuronii le transmit şi le pot recepta. De aici, foarte popular a fost un aşa-numit „principiu al rezonanţei" aplicat la creşterea sistemului nervos (Weiss, 1931). Acest principiu pornea de la analogia cu un telefon la care mesajul nu depinde de forma receptorului şi rezuma rezultate ale unor experimente în care se arătase că muşchii, ca ţinte postsinaptice, răspund selectiv la frecvenţe specifice ale impulsurilor electrice înregistrate numai în nervii corespunzători. Această specificitate explică şi reinervarea specifică a muşchiului cu răspuns miotipâc (pentru o sinteză, vezi: Weiss, 1936). Principiul rezonanţei a coexistat însă cu teza conform căreia formarea sinapselor în timpul dezvoltării sistemului nervos este difuză şi nespecifică.

În aceeaşi perioadă apăreau însă studii care susţineau că extinderea proceselor de creştere şi formarea sinapselor este foarte specifică. Această din urmă idee, cunoscută sub numele de teoria chemoafinităţii, a fost propusă şi susţinută experimental de către R.W. Sperry (1948, 1963 a). Stabilirea conexiunilor nervoase nu mai era considerată un proces strict stereotaxic, depinzând exclusiv de contactul cu suprafeţe solide (membrane celulare). Harrison (1914) indicase că fibrele nervoase trebuie să crească în contact cu suprafeţe sau interfeţe solide, ele neputând creşte în medii gazoase sau lichide simple, din care lipsesc substanţe morfogene. Sperry şi colaboratorii arată însă că creşterea fibrelor nervoase este

foarte specifică şi pune la baza acestei specificităţi ceea ce el numeşte chemoafinitatea sau chemotaxia. În experimentele sale, după ablaţia hemiretinei dorsale de la broască şi secţionarea nervului optic, fibrele optice care se regenerează păstrează nu numai specificitatea terminalului la nivelul căruia fac sinapsă, adică tectumul optic dorsal (la mamifere, colicului superior), ci şi specificitatea căii centrale pe

care o urmează (Sperry, 1943; Fig. 4.6, 4.7 şi 4.8). Teoria chemoafmităţii consideră că circuitele nervoase din creier se dezvoltă, se asamblează şi se organizează sub controlul unor factori chimici specifici unui tip de terminal postsinaptic (Sperry, 1963 b; Fig. 4.9). Deşi această teorie are putere explicativă, ea a fost mai recent criticată pentru că presupune existenţa unui număr mare de gene care să codeze diverse molecule, etichete pentru un traseu chemospecific (Gottlieb & Glaser, 1981).

hemiretina dreapta tectumul stâng ex cazata ««zb-S! p

loc de secţiune a nervului optic ***jr***

Fig. 4.6 *După excizarea hemiretinei drepte şi secţiunea nervului optic, fibrele nervoase din retina ventrală regenerează şi formează sinapsele tipice doar în tectumul dorsal.* (Modificat după Sperry, 1963 a)

Variante ale teoriei chemoafinităţii (ipoteza modulării) se bazează pe experimente în care s-a arătat că, chiar şi în cadrul aceluiaşi fenotip neuronal, conurile de creştere pot fi individualizate prin expresia unor combinaţii de molecule membranare, cum ar fi, de pildă, receptorii lectinei (vezi: Pfenninger & Maylie-Pfenninger, 1981; Dodd & Jessell, 1985). De aici, ideea unei identităţi moleculare a fiecărui con de creştere, care nu presupune existenţa unei diversităţi prea mari de gene care să codeze aceste „etichete", întrucât ea se *bazează,* doar pe *modularea* unor molecule membranare (Edelman, 1982). F. Bonhoffer şi colaboratorii au indicat că şi un gradient molecular topografic poate servi ca mecanism de chemoafinitate, acesta fiind cazul conurilor de creştere ale celulelor ganglionare care proiectează specific, cu ajutorul unui asemenea gradient molecular, spre celulele de la nivelul tectumului optic (Bonhoffer & Huf, 1982; Trisler, Schneider & Nirenberg, 1981). Deşi teoria lui Sperry presupune

Fig. 4.7 *Experimentele lui R. Sperry în care acesta a rotit globul ocular şi a urmărit regenerarea tractului optic. Pe coloana din stânga sunt prezentate observaţiile comportamentale, iar pe coloana din dreapta, observaţiile asupra neuroregenerării nervului optic. A, Când o insectă se află în faţa broaştei, aceasta îşi proiectează foarte precis limba pentru a o prinde; A, conexiune retino-tectală normală. B, Când ochiul este rotit cu 180°, fără a fi secţionat nervul optic, limba broaştei*

are o traiectorie care se abate de la direcţia corectă cu 180°. C, Dacă se roteşte şi ochiul cu 180° şi se secţionează şi nervul optic, la început, broasca este oarbă, dar, după ce nervul optic se regenerează şi animalul îşi recapătă vederea, traiectoria limbii se abate tot cu 180° de la direcţia corectă pentru a prinde musca; C, rotirea ochiului şi secţionarea nervului optic; C", după rotire cu 180° şi secţionare, nervul optic creşte tot spre ţintele sale tecatel originale, astfel că broasca vede obiectele în locaţii deviate cu 180° de la locaţia lor reală. NO, nerv optic; TO, tectum optic. (Modificat după Pinel, 1990)

chemoafinitate punct cu punct, adică pentru fiecare con de creştere/ţintă postsinaptică, studii experimentale mai recente susţin chemoafinitatea pentru o I întreagă populaţie de neuroni pre- şi postsinaptici (teoria gradientului topografic). De pildă, celulele ganglionare din retină dispun de un asemenea gradient molecular I specificat după axele sus-jos, dreapta-stânga, care permite ghidarea conurilor de I creştere până la tectumul optic, unde se organizează astfel încât proiecţiile să păstreze poziţia relativă din reţeaua originară (Easter & colab., 1985).

Teoria gradientului topografic este susţinută de trei categorii de rezultate experimentale. Aşa cum prezice această teorie, proiecţiile retino-tectale respectă 1 poziţia retinotopică chiar dacă sunt lezate retina sau tectumul optic: dacă este lezată I o porţiune de retină la broasca adultă, fibrele se redistribuie astfel încât să

223

tectum optic B

retină **i**

I

Fig. 4.8 *Regenerarea tractului optic de la broască după ce porţiuni din retină sau din tectumul optic au fost excizate. A, axonii din tractul optic cresc şi se proiectează într-o manieră ordonată la nivelul tectumului optic, ceea ce a sugerat ideea chemoafinităţii punct cu punct; B, Când a fost distrusă jumătate din retină, axonii din jumătatea de retină integră şi-au extins aria de proiecţie umplând tot tectumul optic; C, când a fost distrusă jumătate din tectumul optic, axonii celulelor ganglionare cresc după ordinea tipică şi îşi păstrează distribuţia la nivelul jumătăţii de tectum integru.* (Modificat după Pinel! 990)

A * &;

Fig. 4.9 *Teoria chemoafinităţii presupune ghidarea chemotactică*

secvenţială a creşterii fibrei nervoase. Neuroblastul extinde numeroase filopodii cu care testează direcţiile de creştere. Factorii care determină traseul de creştere şi ce filopodie va forma cea mai stabilă conexiune sunt de natură chimică. Neuroblastul are numeroase alte trasee cu ţinte disponibile (A, B sau C), pe care le poate chiar urma temporar, dar care nu se stabilizează datorită adeziunii selective diferite. (Modificat după Sperry, 1965) >... *v*...

proiecteze în întreg tectumul optic; dacă este lezat tectumul, fibrele retino-tectale îşi restrâng distribuţia astfel încât să proiecteze corect în porţiunea tectală rămasă (Gaze & Sharma, 1970; Yoon, 1971). În timpul dezvoltară, suprafaţa retinei şi a tectumului se măresc, dar şi proiecţiile retino-tectale îşi schimbă partenerul teclai postsinaptic, astfel încât să îşi păstreze poziţia corectă, în pofida modificării câmpurilor celulare (Gaze & colab., 1979; Reh & Constatine-Paton, 1984). Alte studii indică faptul că, dacă, de timpuriu, sunt rotiţi ochii la embrionul de broască cu 180°, astfel încât segmentul de retină care, în mod normal, ar fi în partea ventrală să se dezvolte în partea dorsală, proiecţiile retino-tectale se rearanjează şi

axonii cresc într-o distribuţie tipică: retina „ventrală" situată dorsal proiectează în tectumul dorsal, conform noii sale locaţii (Jacobson, 1968). Este probabil ca acest traseu să fie controlat de un gradient topografic de tipul celui considerat de Sperry.

4.4 Dezvoltarea şi asamblarea sinapsei

Sinaptogeneza este, în primul rând, un proces de creştere. În consecinţă, una din primele întrebări la care trebuie să răspundem este: ce determină motilitatea celulei? Cu alte cuvinte, trebuie să explicăm factorii şi mecanismele care susţin extinderea unor procese de creştere neuronale. Dar să nu uităm că sinapsa este un joc în doi dintre componenta presinaptică, adică un con de creştere care va deveni axon şi componenta postsinaptică, reprezentată în majoritatea cazurilor de dendrite. Ambele componente au o motilitate marcată înainte de formarea efectivă a sinapselor, aşa că va trebui să le tratăm separat.

4.4.1 Dezvoltarea conului de creştere

Odată ce neuroblastul a migrat în poziţia tipică, el începe să îşi extindă un axon şi dendrite pentru a face şi a contacta sinapse cu alte celule. Vârful proceselor pe care şi le extinde neuronul are o formă

neregulată, fapt descris splendid de Ramón y Cajal (1890), şi sunt capabile de creştere, locomoţie şi ceea ce se cheamă fasciculaţie, adică tendinţa axonilor de a urma aceeaşi cale stabilită de axonii care au crescut şi s-au stabilizat anterior (Kuwada, 1986; Johnston & Wessels, 1980; Letourneau, 1982). Tocmai de aceea vârful acestor procese se numeşte con se creştere şi el este responsabil de direcţionarea procesului în zona ţintă unde se găseşte celula sau celulele cu care trebuie să facă sinapsă **(Fig. 4.10).** Conul de creştere este cel care va recunoaşte celula ţintă în timpul sinaptogenezei şi va deveni terminal presinaptic. Harrison (1907) stabileşte primele culturi de celule nervoase şi observă că un con de creştere are o activitate amoeboidală, emiţând şi retrăgând proiecţii filiforme (filopodii) şi proiecţii sub forma unor prelungiri ondulate (lamelopodii). Cum se dezvoltă conul de creştere? Există două posibilităţi: fie este adăugat material nou la baza acestuia, fie materialul este transportat în vârful conului de creştere. A doua variantă a fost probată experimental, demonstrându-se că dacă este secţionat axonul, conul de creştere continuă să se extindă timp de câteva ore după leziune (Shaw & Bray, 1977; Wessels, Johnston & Nuttall, 1978). Pe lângă forţa cinetică impusă de adăugarea unor polimeri de molecule la polul pozitiv al microtubulilor, fapt deja discutat în cazul migrării neuronale, se pare că motilitatea conului de creştere depinde în mare măsură de adezivitatea cu celulele adiacente. E ca şi cum neuronul este uns cu un lipici cu proprietăţi speciale, a se înţelege moleculă de adeziune, care aderă mai slab sau mai puternic în funcţie de cât de asemănător este lipiciul de pe celulele spre care proiectează conul de creştere. Acest material care este adăugat conurilor de creştere are aspectul electronmicroscopic al unor vezicule agranulare care par să derive din reticulul endoplasmatic neted, un organit celular care este abundent la

nivelul neuroblastului (Pfenninger & Maylie-Pfenninger, 1981). Mişcarea filopodială are aparenţa unui pas de tango, întrucât filopodiile se extind, au o mişcare laterală şi se scurtează şi sunt „supte" la nivelul conului de creştere, această ultimă secvenţă fiind asociată cu „tragerea" înainte a conului de creştere (Bray & Chapman, 1985).

Fig. 4.10 *Conul de creştere. Imaginile electronmicroscopice*

reprezintă un con de creştere din vârful unui axon al unui neuron prelevat dintr-un ganglion simpatic de la şobolan, în stânga, şi al unei dendrite a unui neuron piramidal hipocampic de la şobolan, în dreapta. O lamelopodie este delimitată cu paranteză pătrată, iar o filopodie este indicată de săgeată. (Modificat după Cowan, 1979)

Motilitatea conului de creştere este mediată de microfilamentele de actină care se găsesc aici. P.C. Letourneau a observat pentru prima dată că actină este organizată sub forma unor complexe fibroase, denumite microfilamente, iar miozina este prezentă de-a lungul periferiei conului de creştere (Letourneau, 1981). Se pare că poziţionarea microfilamentelor de actină depinde de contactul adeziv al conului de creştere cu altă celulă, întrucât aceste organite sunt aliniate în zona în care conul de creştere aderă la o altă celulă sau la substraturi cum ar fi fibronectina, laminina sau colagenul – (Letourneau, 1975, 1979). Tot Letourneau a sugerat că microfilamentele de actină şi adeziunea celulară sunt mecanismele prin care sinapsa se stabilizează numai când conul de creştere a găsit celula potrivită: adeziunea poate fi mai slabă, datorită faptului că celulele exprimă molecule de adeziune diferite sau la niveluri diferite. În acest caz, motilitatea microfilamentelor de actină obligă „ruperea" contactului. Sau adeziunea poate fi puternică, mediată de cuplarea homofilică a moleculelor de adeziune de pe cele două membrane şi atunci microfilamentele nu vor „aluneca", ci vor „trage", în asociere cu miozina, conul de creştere spre zona de contact intercelular. Oricum, conul de creştere este tensionat, astfel că, dacă este eliberată filopodia de ia nivelul unui contact puternic, ea înregistrează o mişcare rapidă de recul spre zona nemanipulată (Bray, 1979).

226

Celulele gliale par să ofere o platformă de elecţie pentru conurile de creştere ale neuroblaştilor (Foucaud & colab., 1982), cel puţin *in vitro,* fapt susţinut şi de rolul celulelor gliale în migrarea neuroblaştilor. Adeziunea neuron-celulă glială ar putea fi mediată de molecule cum ar fi molecula de adeziune celulară neuron-celulă glială (Ng-CAM) care este exprimată pe conul de creştere, respectiv, de unele glicoproteine cum ar fi citotactina sau JI, care sunt prezente pe membrana celulelor gliale (Grumet & colab., 1985; Kruse & colab., 1985). Conurile de creştere şi celulele gliale exprimă şi molecula neuronală de adeziune celulară (N-CAM), într-un gradient ce pare să

descrie traseele majore ale axonilor celulelor ganglionare spre tectum, de pildă (Schlosshauser, Schwarz & Rutishauser, 1984).

Care sunt factorii care susţin motilitatea conului de creştere? Vom discuta mai întâi factorii chemotactici. Cel mai bine studiat chemoatractant este factorul de creştere neuronal (NGF) care acţionează direct asupra celulelor senzitive în timpul perioadei embrionare şi fetale de dezvoltare şi asupra celulelor sistemului nervos vegetativ simpatic, pe tot parcursul vieţii (Levi-Montalcini & Cohen, 1960; dar şi: Levi-Montalcini & Angeletti, 1961; Levi-Montalcini, 1964). Injectarea de NGF la şoarecii nou-născuţi determină un răspuns hiperplastic şi hipertrofie în ganglionii senzitivi şi simpatici şi suprainervarea viscerelor (Levi-Montalcini & Hamburger, 1953). NGF pare să aibă o acţiune directă asupra conului de creştere (Seeley & Greene, 1983). Un experiment elegant în care neuronii au fost cultivaţi într-un recipient cu trei compartimente a demonstrat că neuroblaştii îşi extind procese de creştere numai către compartimentele în care se găseşte morfogenul. Mai mult, dacă pericarionul neuroblastului, dar nu şi procesul şi conul de creştere, este menţinut în prezenţa NGF, acestea din urmă degenerează (Campenot, 1977). NGF favorizează creşterea conului prin facilitarea adeziunii intercelulare şi creşterea fluidităţii membranei (Connoly, Seeley & Greene, 1985). NGF poate induce formarea unei glicoproteine cu rol în adeziunea celulară, denumită glicoproteina externă cu greutate moleculară mare NGF-indusă (NILE**3**, *NGF-induced large externai glycoproaein),* care este localizată mai ales pe procese şi mai puţin pe corpul neuronal (Stallcup, Beasley & Levine, 1985). Mai recent, s-a arătat că şi alţi factori au un rol similar cu NGF, modulând adezivitatea conului de creştere al neuroblastului. Sursa acestor factori de creştere este, de cele mai multe ori, celula postsinaptică, care secretă şi eliberează aceşti factori retrograzi (pentru detalii, vezi: Fitzsimonds & Poo, 1998).

Câmpurile electrice extracelulare pot şi ele influenţa conul de creştere neuronal. Depinzând de tipul câmpului electric şi de direcţia de creştere a conului, acesta din urmă poate fi fie atras, fie respins de către câmpul electric (Patel & Poo, 1984; Patel & colab., 1985). Un posibil mecanism subiacent ar putea fi difuzia laterală şi acumularea de glicoproteine cu rol în adeziunea celulară, la nivelul membranei conului de creştere (Patel & Poo, 1982). Un alt mecanism, probabil.

3 NILE este identică imunocitochimic cu molecula de adeziune LI, al cărei rol este detaliat în capitolul despre morfogeneza şi regionalizarea timpurie a sistemului nervos şi capitolul despre mielinizare.

227

complementar, este concentraţia extracelulară a potasiului (K +) (Sussdorf & Campenot, 1986). Gradientul de K + creează o depolarizare care se propagă retrograd de la vârful conului de creştere, împiedicând transportul anterograd al veziculelor încărcate pozitiv care participă la creşterea procesului. Se speculează că deschiderea canalelor ionice care se găsesc la nivelul conului de creştere se asociază cu creşterea celulei, în timp ce închiderea lor ar corela cu stoparea creşterii procesului. Alte studii incriminează calciul în creşterea şi adeziunea conului de creştere neuronal (Anglister & colab., 1982). Astfel, au fost identificate canale ionice specifice pentru Ca2 + în conul de creştere, Ca2 + intracitoplasmatic fiind necesar pentru inserţia moleculelor de adeziune în membrana filopoidală (Cohen, Haydon & Kater, 1985).

Importanţa contactului celular în dezvoltarea conului de creştere este evidenţiată nu numai prin rolul jucat de adeziunea celulară, dar şi prin existenţa unor conuri de creştere pionier, care „bătătoresc" traseul pe care axonii care vin în urmă vor fascicula. Ipoteza unor astfel de conuri de creştere pionier poate explica ceea ce adeziunea, teoria chemotactică şi influenţa" activităţii electrice nu pot explica: schimbarea rapidă, într-un unghi mare, a direcţiei de mişcare a conului de creştere, fapt observat mai ales la embrionul de lăcustă (Bentley & Keshishian, 1982). Conurile de creştere pionier marchează rute diferenţiate, probabil, din punct de vedere chemotactic, celulele ale căror procese de creştere le urmează neavând decât să refacă traseul conurilor pionier. Deşi, iniţial, s-a arătat că distrugerea conurilor pionier împiedică proiectarea tipică a axonilor (Kuwada, 1986), C: S. Goodman şi colaboratorii au arătat că rolul conurilor de creştere pionier este de a marca un traseu, dar traiectoria conurilor de creştere care îi urmează nu este impusă de acesta (Raper, Bastiani & Goodman, 1983). Conurile de creştere pot să „îşi aleagă" dintre traseele de fasciculaţie, putând creşte de-a lungul unor căi axonale alternative etichetate.

Astfel, teoria iniţială numită sugestiv ipoteza amprentei

(*blueprint hypothesis;* Singer, Nordlander & Egar, 1979) a fost amendată ca ipoteză a căilor etichetate *(labelled pathway hypothesis).* Aceasta din urmă este susţinută de mai multe studii experimentale, poate şi pentru că este mai permisivă: ipoteza amprentei presupune ca toate conurile de creştere să fasciculeze după un con de creştere pionier unic, iar ipoteza căilor etichetate susţine că fasciculaţia unui con de creştere depinde şi de solidaritatea topologică cu axonii tractului din care face parte. Predicţia a fost confirmată în cazul tractului corticospinal, extensia conului de creştere fiind împiedicată de ablaţia axonilor acestui tract (Schreyer & Jones, 1982, 1983). S-a arătat că filopodiile conurilor de creştere se însera selectiv pe unele conuri de creştere ale axonilor dintr-un tract, fenomen asociat cu endocitoza unor vezicule. Acest proces de endocitoza ar putea informa maşinăria biochimică a celulei despre unde se găseşte conul de creştere şi ce face acesta şi ar putea influenţa schimbarea expresiei moleculelor de adeziune (vezi şi: Williams, Borodkin & Rakic, 1991).

Dezvoltarea conului de creştere depinde de disponibilitatea ţintei postsinaptice. Dacă aceasta este înlăturată, creşterea conului este inhibată. Unele

dovezi vin din studii efectuate la *Drosophila.* Sistemul fibrei gigant este un circuit neuronal simplu format din doi interneuroni, circuit care este activat de stimuli vizuali şi stimuli care acţionează asupra aripii insectei, mediind comportamentul de evitare al acesteia (Thomas & Whyman, 1983). Fiecare axon coboară în ganglionul mezotoracic unde face sinapsă cu un motoneuron. S-a arătat recent că dacă este împiedicată creşterea ţintei postsinaptice (motoneuronul), axonul fibrei gigant nu mai fasciculează corect, ceea ce sugerează că, măcar în parte, creşterea preocesului presinaptic este dependentă de morfogeneza corectă şi disponibilitatea ţintei postsinaptice (Jacobs & colab., 2000). Mai mult, stabilizarea sinapsei depinde de interacţiunea şi contactul dintre cele două celule. De pildă, activarea receptorilor pentru unii neurotransmiţători sau factori de creştere stimulează creşterea nivelului de Cz intracelular prin activarea cascadei fosfatidil-inozitol-4, 5-bifosfatului, care produce inozitol fosfaţi (pentru o sinteză, vezi: Nishizuka, 1984; Berridge & Irvine, 1984). Dintre aceştia, inozitol trifosfatul mobilizează la + din depozitele intracelulare. Într-adevăr, există tot mai multe studii care sugerează

necesitatea mobilizării Ca2 + din depozitele intracelulare pentru dezvoltarea conului de creştere.

4.4.2 Dezvoltarea arborelui dendritic în ceea ce priveşte componenta postsinaptică, şi aici sinaptogeneza este un proces foarte dinamic. Contactul dintre terminalul presinaptic şi ţinta postsinaptică este urmat de adeziune şi apariţia unor specializări în zona de contact a ambelor celule. Înainte de contact, în celula presinaptică se remarcă depozitarea unor vezicule cu neurotransmiţător, substanţa care mediază interacţiunea dintre cele două celule în cazul sinapselor chimice, într-o zonă în care membrana este mai îngroşată, numită zonă activă. Să ne amintim că, în celula postsinaptică, zona în care sunt aglomeraţi receptorii se numeşte densitate postsinaptică. Sinaptogeneza are două componente: procese care au loc înainte de contactul dintre componenta pre- şi postsinaptică (diferenţiere), dar şi evenimente care se întâmplă după ce acestea aderă una la cealaltă, cum ar fi ramificarea terminalului postsinaptic, eliminarea unor sinapse şi modificarea compoziţiei receptorilor (Schaefer & Nonet, 2001). În genere, însă, sinaptogeneza se referă la toate procesele care conduc la o sinapsă adultă.

Dendritele neuronilor sunt ţinta de elecţie a sinapselor excitatoare, majoritatea axodendritice, în sistemul nervos central; este justificat, deci, să luăm arborizaţia dendritică ca prototip de ţintă postsinaptică. Acestea sunt echipate cu structuri specializate pentru contactarea sinapselor, sub forma unor butoni cu diametrul de – 20 um, distribuiţi de-a lungul dendritelor, denumiţi spini dendritici

I (pentru o sinteză, vezi: Harris & Kater, 3994). Un eveniment important în

I dezvoltarea celulei şi sinaptogeneza este ramificarea arborelui dendritic, care se

I consideră că este influenţată de impulsurile aferente pe care le primeşte celula.

I Astfel, putem spune că neuronul este o celulă polarizată pentru că informaţia.

I codată sub forma impulsurilor nervoase, este preluată de celulă la polul dendritic şi condusă către arborizaţia terminală şi sinapsa cu alte celule. De aici, cu cât o celulă

are o arborizaţie dendritică mai dezvoltată, putem postula că

acea celulă procesează mai multă informaţie.

Dezvoltarea arborizaţiei dendritice a unui neuron în dezvoltare presupune extinderea unor procese de creştere, ce se diferenţiază apoi în dendrite. La început acestea nu prezintă spini dendritici, deci, se poate spune că nu posedă structuri specializate care să faciliteze contactarea sinapselor. Observaţii confirmate destul de recent au indicat că, la început, dendritele prezintă vârfuri cu procese filopodiale, numite simplu filopodii dendritice care apar în culturile de neuroni hipocampici din câmpul CAI, de pildă; după circa 1 – 2 săptămâni iniţiale în cultură şi au o motilitate marcată, extinzându-se şi retrăgându-se cu o frecvenţă de <10 min. După 4 luni în cultură, pe aceşti neuroni se găsesc distribuiţi relativ omogen spini dendritici. Acestea dispar pe măsură ce cortexul se maturează, lăsând în urmă spinii dendritici. Până de curând, nu a fost clar dacă spinii dendritici se formează din filopodiile dendritice, cu alte cuvinte, dacă filopodiile dendritice contactează sinapse şi se diferenţiază apoi în spini dendritici (Ziv & Smith, 1996).

Am stabilit că există sinapse simetrice, pe trunchiul şi ramurile dendritelor şi sinapse asimetrice, cel mai probabil excitatoare, pe spinii dendritici. Electronmicroscopic, sinapsele din girusul dinţat din hipocampul puilor de şobolan în perioada sinaptogenezei (P l-ţi 12) pot fi categorizate m şi mai multe clase: (a) sinapse pe trunchiul dendritic identificat prin prezenţa microtubulilor şi mitocondriilor; (b) sinapse pe o protruzie dendritică scurtă şi lată („gât") pe suprafaţa unei dendrite; (c) sinapse pe spini dendritici definiţi ca o protruzie scurtă (<2 um) separată de dendrită printr-o porţiune îngustă; (d) sinapse filopodiale, la care filopodiile sunt protruzii care nu au doar un singur vârf şi sunt mai lungi decât spinii dendritici; (e) sinapse contactate pe conuri de creştere şi pe lamelopodii, identificate ca protruzii dendritice plate, cu citoplasmă granulară şi numeroase compartimente veziculare (Fiala & colab., 1998). Studiul citat demonstrează foarte clar că filopodiile dendritice sunt esenţiale pentru sinaptogeneză. Statistic, acest rol înseamnă că: la P 6, există în medie, 6.2 filopodii dendritice/100 *[im3,* cu o durată de viaţă de circa 10 minute. Aceste date, extrapolate la întreaga populaţie de filopodii presupune că apar 4.65 noi filopodii dendritice/100 um3/h. Foarte interesant, faţă de 223 de sinapse filopodiale/100 um3/48 h, sinapsele non-filopodiale sunt mult mai puţine (circa 14.6 sinapse/100 um3/48

h). Dintre sinapsele filopodiale, sunt păstrate numai aproximativ 7% între P 4 şi P 6. Sinapsele pe spini dendritici se diferenţiază, într-adevăr, din sinapse pe trunchiul dendritic, deci, spinii ar putea apărea prin creşterea unor protruzii pe trunchiul dendritic. Sinapsele pe gât dendritic par să fie o formă intermediară (Fiala & colab., 1998). Oricum, concluzia este că scopul filopodiilor dendritice este nu de a forma spini, ci, mai degrabă, de a facilita stabilirea sinapselor pe trunchiul dendritic pentru că filopodiile participă mai frecvent la recrutarea de noi sinapse decât la formarea unor spini maturi.

Spinul dendritic este foarte dinamic în perioada sinaptogenezei. În afară de extinderea şi retragerea spinilor, precursorii acestor structuri sunt modelaţi, având diferite morfologii, prin alungire, divizare, extinderea unor filopodii de la nivelul

230

unor spini deja formaţi. Aceste observaţii au fost confirmate la celulele Purkinje din scoarţa cerebeloasă, la neuronii piramidali din hipocamp şi izocortex (Dunaevsky & colab., 1999). Această motilitate extraordinară a spinului dendritic ar putea fi pur şi simplu un mecanism prin care sunt „căutate" terminalele presinaptice cu care ar putea face sinapsă, dar este şi un mecanism prin care este modulată eficienţa sinapsei prin modificarea mărimii fantei sinaptice sau a numărului de receptori postsinaptici. Ce determină această motilitate? Unele cercetări, astăzi clasice, indică faptul că arborele dendritic îşi stabilizează orientarea în funcţie de direcţia aferentei, ceea ce ar indica un rol crucial al activităţii electrice (Greenough & Chang, 1988; Katz & Constantine-Paton, 1988). Se pare însă că există un nivel de bază al motilităţii spinului dendritic care este independent de activitatea neuronală declanşată de sosirea aferentei. Alte cercetări susţin importanţa contactului dintre conul de creştere al celulei presinaptice şi celula postsinaptică: filopodiile conurilor de creştere axonale, când contactează filopodiile celulei ţintă, aderă şi cresc de-a lungul acestora (Cooper & Smith, 1992) ...

Motilitatea dendritică dispune de mecanisme specifice. Cercetări recente arată că citoscheletul componentei postsinaptice este foarte specializat. Citoscheletul dendritei include o componentă microfilamentoasă (zona A) la nivelul spinului dendritic; această componentă are o dinamică rapidă. La baza spinului dendritic se găsesc mai ales microtubuli (zona M), mai stabili structural, cu o

dinamică de reorganizare mai lentă. Cele două organite mediază un echilibru între plasticitatea spinului dendritic (a) şi stabilitatea acestuia (M), fiind, probabil, asociate prin intermediul proteinei asociată microtubulilor de tip 2 (MAP-2, *microtubule associated protein 2).* Materialul vezicular este transportat de la nivelul corpului, celular până la spinul dendritic cu ajutorul unor molecule cu rol de motor molecular: dineina şi kinezina în cazul microtubulilor şi miozina în cazul microfilamentelor de actină. Această specializare ultrastructurală mediază plasticitatea sinapselor chiar şi la neuronii maturi (pentru detalii, vezi: Kaech & colab., 2001). Descoperirea are două implicaţii. În primul rând, iată, avem un mecanism specializat care determină modificări structurale care se asociază cu creşterea inputurilor pe care le centralizează celula prin contactarea mai multor sinapse sau modularea celor vechi. Cu cât o celulă are o arborizaţie dendritică mai extinsă, cu atât ea contactează mai multe sinapse şi prelucrează mai multe inputuri. În al doilea rând, segregarea topologică şi funcţională dintre microtubuli şi microfilamente oferă un mecanism concret pentru implementarea celor trei stări postulate de teoria lui Changeux: microfilamentele mediază mai direct labilizarea, iar microtubulii mediază mai direct stabilizarea.

În funcţie de rata de creştere, H. Cline şi colaboratorii au divizat dezvoltarea arborelui dendritic în trei faze. În prima fază, neuronul iese din ciclul celular, se diferenţiază din celula neuroepitelială şi îşi extinde prelungiri, dintre care cea care creşte rapid va deveni axon, iar celelalte procese minore, dendrite. Arborele dendritic nu îşi modifică semnificativ în această fază lungimea sau ramificaţia. În faza a doua, se produce o creştere rapidă a arborelui dendritic.

urmată gradual, în faza a treia, de decelerarea creşterii acestuia. Neuronii în faza I au lungimea totală a braţelor dendritice de – 100 (im, cei din faza II de 100 – 400 u. m, iar cei din faza III de 400 um. Neuronii din faza III sunt mai stabili decât cei din fazele anterioare, rata de extinderi şi retrageri a dendritelor scăzând la jumătate (Fig. 4.11).

Fig. 4.11 *Dezvoltarea polarităţii neuronale în culturi de mare densitate de neuroni hipocampici. A, B, C, D, neuroni la 0,1, 2, respectiv, 3 zile în cultură. Se observă extinderea unui număr mare de procese dintre care unele se diferenţiază în axoni (săgeată în B).* (Adaptat după

Hirschberg & colab., 1996, cu permisiunea autorilor)

Corelaţia acestor faze de creştere cu activitatea sinaptică este cel puţin interesantă: iniţial, neuronii nu înregistrează activitate sinaptică; ulterior, aceştia afişează activitate sinaptică mediată de receptorii NMDA, care sunt, iniţial, mai mulţi decât receptorii AMPA (a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-acid isoxazol propionic), un tip complementar de receptor glutamatergic, pentru ca, apoi, activitatea sinaptică să fie mediată mai ales de receptorii AMPA. Deci faza II a creşterii dendritice rapide poate fi corelată temporal cu activitatea sinaptică NMDA-dependentă, iar faza III cu activitatea sinaptică mediată de receptorii AMPA (Rajan & Cline, 1998; Rajan, Witte & Câine, 1999; Cline & colab., 1999). Aceste date indică importanţa activităţii sinaptice în dezvoltarea arborelui dendritic. Morfologia arborelui dendritic, adică ramificarea sa şi aria pe care o acoperă dendritele, numită câmp dendritic, sunt relevante funcţional. Astfel, neuroni cu arbori denşi şi foarte ramificaţi, cum ar fi neuronii stelaţi din izocortex, au rate de descărcare diferite de cele ale neuronilor cu arbori dendritici cu ramificaţii mai difuze (Mainen & Sejnowski, 1996). De altfel, se ştie că un control al extinderii laminare a arborelui dendritic este esenţial pentru stabilirea circuitelor nervoase tipice (pentru o sinteză, vezi: Câine, 2001).

4.4.3 Unele condiţii ale sinaptogenezei

Formarea sinapsei în sine depinde de condiţii trofice şi de contact. Majoritatea cercetărilor au fost făcute la moluşte la care sistemul nervos, organizat

În structuri ganglioflare, conţine un număr redus de neuroni, între 10 şi 100 de mii de celule cu o poziţie stereotipică la toţi indivizii (pentru detalii, vezi: Kandel, 1979). Aceste studii au încercat să tranşeze dacă factorii trofici sau condiţiile de contact celular sunt mai importante pentru formarea sinapselor. Pentru' a putea vedea care sunt factorii care influenţează direct formarea sinapsei, P.G. Haydon şi colaboratorii au dezvoltat un sistem experimental în care corpurile celulare a doi neuroni sunt juxtapuse în cultură, astfel că se poate forma o sinapsă somato-somatică, atipică altfel *in vivo* pentru sistemul nervos (Haydon, 1988). Avantajul acestei abordări este că pot fi studiate mecanismele ionice şi sinaptice care controlează sinaptogeneza, în absenţa creşterii dendritice. Între corpurile celulare

juxtapuse se formează sinapse specifice, astfel că dacă sunt juxtapuse în cultură corpurile unui neuron presinaptic dopaminergic şi al ţintei sale postsinaptice, tot dopaminergică, se formează o sinapsă dopaminergică tipică. Mai mult, aceste sinapse afişează un răspuns sinaptic inhibitoriu atunci când este stimulat electric neuronul presinaptic. În această situaţie, formarea acestor sinapse necesită sinteză de proteine, sinaptogeneza fiind blocată de administrarea în cultură a unor inhibitori nespecifici ai sintezei de proteine, cum ar fi anisomicina. Sinaptogeneza este independentă de factori trofici şi molecule de adeziune şi nu depinde doar de disponibilitatea şi interacţiunea dintre neurotransmiţători şi receptorii potriviţi (Feng & colab., 1997). Argumentul pentru această ultimă afirmaţie provine din observaţia că neuronul presinaptic face în cultură sinapsă numai eu ţinta sa tipică *in vivo,* nu şi cu alt neuron dopaminergic.

Studii mai recente indică, însă, că factori trofici cum ar fi, factorul neurotrofic ciliar (CNTF, *ciliary neurotrophi e factor)* şi condiţiile de contact sunt necesare pentru sinaptogeneza (Syed, Richardson & Bu. lloch, 1996). Astfel medii de cultură suplimentate cu factori neurotrofici susţin sinaptogeneza, în timp ce în medii din care aceşti factori lipsesc, corpurile celulare juxtapuse a doi neuroni nu realizează sinapse (Magoski & Bulloch, 1998). P.G. Haydon şi P. Drapeau susţin că unii neuronii îşi sintetizează sistemul secretor înainte de formarea sinapsei, aceştia putând forma sinapse relativ independent de condiţiile de cultură. Alţi neuroni, însă, au nevoie de semnale pentru a îşi sintetiza sistemul secretori sau pentru a fi face Ca**2 +** – dependent. Pentru aceşti din urmă neuroni, condiţiile trofice şi de contact sunt necesare pentru sinaptogeneza (Haydon & Drapeau, 1995).

4.5 Joncţiunile de tranzit (gap) şi activitatea electrică spontană în mod tradiţional, se consideră că formarea circuitelor nervoase depinde, în perioade embrionare şi fetale timpurii, de mecanisme activitate-independente, iar, după iniţierea activităţii electrice evocate, aceasta ar fi controlată mai ales de mecanisme activitate-dependente. Evenimente timpurii cum ar fi stabilirea fenotipului celulei, selectarea ţintei postsinaptice, distribuţia iniţială a sinapselor ş.a., ar depinde, conform acestei dihotomii, exclusiv de mecanisme intrinseci, genetice, deci, independente de activitatea electrică; după maturarea aferentelor şi iniţierea activităţii electrice evocate, după naştere,

procese ca rafinarea sinapselor

ar fi sub controlul cardinal al activităţii neuronale (Goodman & Shatz, 1993; Greenough, Black & Wallace, 1996).

Există tot mai multe dovezi că această categorizare teoretică nu este foarte riguroasă. Formarea circuitelor nervoase depinde în mare măsură de activitatea electrică pe care neuronii o generează spontan, înainte de maturarea aferentelor. De pildă, infuzarea unor agenţi care blochează potenţialele de acţiune spontane din perioada prenatală opresc formarea proiecţiei retino-geniculate. Chiar maturarea proiecţiilor talamo-corticale depinde, aşa cum am văzut, de activitatea electrică. Aceste descărcări spontane ale neuronilor se sincronizează la întregi populaţii neuronale, astfel că iau naştere adevărate „valuri" de potenţiale de acţiune asociate cu creşteri temporare ale nivelului calciului intracelular. Sincronizarea are loc prin mecanisme extracelulare, adică prin difuziunea neurotransmiţătorilor, sau prin mecanisme intracelulare, la nivelul unor joncţiuni de mare conductanţă ionică, numite şi joncţiuni strânse sau joncţiuni de tranzit (*gap junctions).* Vom folosi ultimul termen datorită apropierii sale de termenul originar din limba engleză. Este momentul să subliniem că, în sistemul nervos nu există numai sinapse chimice, ci şi sinapse electrice mediate de aceste joncţiuni de tranzit.

Rolul funcţional al joncţiunilor de tranzit a fost recunoscut pentru prima dată de S. Weidmann la celulele Purkinje din scoarţa cerebeloasă (Weidmann, 1952). Funcţia clasică a joncţiunilor de tranzit este conducerea rapidă a impulsului electric. Cu câteva decenii înainte, W.R. Loewenstein descoperise că molecule cu greutate moleculară mică (o.5 kDa) difuzează în celule învecinate ale miocardului. Aceste molecule trec prin canale cu diametru de – 1.5 μm, care sunt foarte dense la nivelul a ceea ce avea să se demonstreze că sunt joncţiunile de tranzit (vezi: Kanno & Loewenstein, 1964). Exemple de molecule care trec prin aceste canale sunt inozitol trifosfatul şi adenozin-monofosfatul ciclic (AMPC), molecule cu rol în transducţia semnalului. Aşa cum am notat, joncţiunile de tranzit permit cuplarea electrică a doua celule, fapt care se dovedeşte relevant pentru formarea circuitelor neuronale (pentru o sinteză, vezi: Caveney, 1985).

Sistemul retino-geniculat oferă un exemplu de circuit în care se

observă regularitatea activităţii electrice spontane înainte de maturarea proiecţiilor şi propagarea acestor descărcări sub forma unor valuri retinale. S-a arătat că, înainte de maturarea fotoreceptorilor şi deschiderea ochilor, întregi populaţii de celule ganglionare înregistrează sincron descărcări ritmice (Galii & Maffei, 1988). Urmărindu-se variabilitatea nivelului de Ca2 + intracelular, s-a descoperit că aceste potenţiale de acţiune se propagă de la un neuron la altul sub forma unui val (Wong & colab., 1995). Descărcările se propagă de la o celulă ganglionară la alta prin joncţiuni de tranzit pentru că sinapsele electrice sunt singurul tip de sinapsă pe care îl pot face celulele ganglionare învecinate (Penn, Wong & Shatz, 1994). Dar celulele ganglionare fac sinapsă şi cu celule modulatoare numite celule amacrine. Sinapsele celulelor ganglionare cu celulele amacrine sunt sinapse chimice şi au drept mediator GABA sau glicina, de cele mai multe ori, dar şi acetilcolina şi linele neuropeptide (MacNeil & Masland, 1998). Aceste observaţii sugerează că şi sinapsele chimice participă la generarea valurilor retinale.

234

Aria totală de retină care susţine un val retinal se numeşte domeniu. Aceste valuri de activitate electrică spontană baleiază mai întâi întreaga suprafaţă a retinei, pentru ca valurile subsecvente, cu o frecvenţă de mai puţin de un minut să respecte domeniile valurilor iniţiale. Fiecare regiune a retinei are capacitatea de a iniţia un asemenea val, deci, domeniile valurilor sunt stabilite strict de istoria activităţii electrice spontane. Mecanismul acestei reguli are la bază existenţa unei perioade refractare de aproximativ 40 de secunde, timp în care celula nu participă la un nou val, cu alte cuvinte, nu poate genera un potenţial de acţiune (Feller & colab., 1997). Blocarea activităţii electrice spontane perturbă creşterea proiecţiei retino-geniculate şi sinaptogeneza între terminalele presinaptice retinale şi celulele postsinaptice din nucleii geniculaţi laterali. Nucleii geniculaţi laterali cuprind 6 straturi, fiecare primind aferente de la un singur ochi: straturile 2, 3 şi 5 primesc aferente de la retina ipsilaterală, iar straturile 1, 4 şi 6 de la cea contralaterală. Această segregare funcţională se consideră că rezultă în urma unei competiţii a aferentelor monoculare pentru celulele retinorecipiente din straturile geniculate. Blocarea prelungită a activităţii electrice spontane prin blocarea canalelor voltaj-dependente pentru Na + din retină împiedică

această segregare a aferentelor la nivelul nucleilor geniculaţi laterali (Penn & colab., 1998). Acest fenomen a fost confirmat la numeroase specii de vertebrate (pentru o sinteză, vezi: Wong, 1999).

Joncţiunile de tranzit au fost identificate şi în alte structuri din sistemul nervos adult, cum ar fi oliva inferioară şi hipocampul (Llinas, Baker & Sotelo, 1974; Perez-Velasquez, Valliante & Carlen, 1994). În altele, aceste joncţiuni există numai temporar, mai ales în timpul maturării proiecţiilor şi stabilirii circuitelor nervoase. În sistemele izocorticale, joncţiunile de tranzit se stabilesc în funcţie de faza din ciclul celular în care se află celula. Astfel, celulele neuroepiteliale sunt cuplate prin joncţiuni de tranzit, apoi, când ies din ciclul celular, precursorii neuronali elimină aceste joncţiuni, iar, în timpul migrării neuroblaştilor, aceştia stabilesc joncţiuni de tranzit cu celulele gliale radiale (Lo Turco & Kriegstein, 1991, 1995). În timpul primei săptămâni după naştere, neuronii piramidali din straturile profunde şi superficiale ale izocortexului sunt cuplaţi prin joncţiuni de tranzit prin intermediul dendritelor apicale ale neuronilor din straturile profunde. Până în a doua săptămână postnatal, aceste joncţiuni dispar din straturile profunde şi mai sunt prezente numai între neuronii din straturile izocorticale II şi III (Peynado, Yuste & Katz, 1993; pentru o sinteză, vezi: Shatz, 1996).

În general, funcţia joncţiunilor de tranzit este conducerea rapidă a impulsului electric; juxtapunerea membranelor a doua celule prin joncţiuni de tranzit modifică proprietăţile electrotonice ale acestora, cum ar fi rezistenţa electrică care scade, cu efect asupra dinamicii curenţilor sinaptici. În izocortex însă conductanţa electrică a joncţiunilor de tranzit este redusă. Prin urmare, s-a sugerat că funcţia acestora aici ar fi mai degrabă metabolică, permiţând transferul rapid al neurotransmiţătorilor. Din această perspectivă, joncţiunile de tranzit pot fi considerate precursor ale sinapselor chimice, cel puţin în izocortexul în dezvoltare. Joncţiunile de tranzit par să medieze sincronizarea expresiei unor proteine cum ar fi subunitatea a a receptorului GABAA (vezi: Yuste, Peinado & Katz, 1992). Celulele

cuplate prin astfel de joncţiuni ar putea să capete prin semnalizare intercelulară acelaşi fenotip (pentru detalii, vezi: Roerig & Feller, 2000).

4.6 Mecanisme moleculare ale dezvoltării şi formării

sinapsei în acest paragraf, vom încerca să discutăm studiile care au investigat unele molecule implicate în sinaptogeneză. O primă categorie de rezultate provine din cercetări efectuate la culturi celulare şi din cercetări biochimice. O altă categorie de date experimentale provine de la *Drosophila*. În acest al doilea caz, „drosofiliştii" par să fi adus din sisteme neuronale simple ca cel al musculiţei pe care o studiază reguli care, plecând de la tematica specifică a sinaptogenezei, ar putea oferi perspective revelatoare asupra modului cum concepem funcţionarea creierului.

O primă clasă de molecule implicate în sinaptogeneză este reprezentată de moleculele de adeziune, în particular, căderinele, cel mai intens studiate astfel de molecule (pentru o sinteză, vezi: Yap, Brieher & Gumbiner, 1997). Una din cele mai importante descoperiri legate de căderine este localizarea selectivă a acestora în diferite populaţii sinaptice. Acest fapt, dată fiind diversitatea căderinelor, ar putea susţine teorii „costisitoare" molecular ale dezvoltării circuitelor şi reţelelor neuronale, cum ar fi teoria lui Sperry care presupune existenţa unor etichete specifice care să stabilească trasee complementare de chemoafinitate pentru fibrele nervoase. Căderinele par adresele perfecte pentru stabilirea sinapselor (vezi, pentru discuţii: Redies, 1997; Ranscht, 2000).

În cazul proiecţiei retino-tectale, atât de invocată datorită disponibilităţii datelor experimentale, fibrele ganglionare exprimă N-caderina (Matsunaga & colab., 1988) şi cresc de-a lungul unor celule gliale care exprimă R-caderina (Wohrn & colab., 1998), cele două molecule de adeziune putându-se lega heterofilic. *In vitro,* s-a arătat că blocarea expresiei N-caderinei opreşte fasciculaţia şi gruparea proiecţiilor ganglionare. N-caderina este, aşa cum era de aşteptat, exprimată şi pe dendritele celulelor din straturile tectumului optic care sunt ţintele postsinaptice ale proiecţiei retinale (Yamagata & colab., 1995). Şi R-caderina este exprimată în aceleaşi straturi, dar ambele molecule de adeziune îşi restrâng domeniul de expresie la nivelul unor populaţii sinaptice specifice, ceea ce pare să sugereze că aceste molecule, şi altele, au rolul de a individualiza (înainte de sosirea terminalului presinaptic) şi de a rafina (după asamblarea sinapsei) compartimente în straturile tectale retinorecipiente (Ranscht, 2000).

În cazul neuronilor motori care proiectează spre ţinte musculare s-a arătat că aceştia exprimă T-caderina şi că legarea

homofilică de celule care exprimă, deci, şi ele aceeaşi moleculă de adeziune determină blocarea creşterii dendritelor şi axonilor (Fredette, Miller & Ranscht, 1996). Aşa se explică de ce axonii acestor neuroni motori ies prin partea rostrală a somitei şi evită partea caudală a acestora, ale cărei celule exprimă T-caderina (Ranscht & Bronner-Fraser, 1991). T-caderina este reprimată în timpul creşterii proiecţiei, dar expresia sa este întărită odată ce fibra nervoasă face sinapsă cu ţinta musculară (Fredette & Ranscht, 1994). Şi

căderinele 6 şi 11 s-a dovedit de curând că sunt exprimate la nivelul unor populaţii selective de sinapse neuromusculare.

În hipocamp, numeroase sinapse din câmpul CAS exprimă N-caderina, pentru ca, ulterior, numai sinapsele excitatorii glutamatergice, nu şi cele inhibitorii GABA-ergice, să păstreze expresia moleculei (Fannon & Colman, 1996; Benson & Tanaka, 1998). S-a demonstrat în culturi neuronale că, în prezenţa depolarizării şi a unor niveluri marcate de potasiu, monomerii de N-caderină dimerizează, aceasta fiind conformaţia în care se pot lega mai stabil de alte molecule de adeziune (Tanaka & colab., 2000). Şi niveluri ridicate de calciu susţin dimerizarea unor căderine, cum ar fi E-caderina (Koch & colab., 1999). Dimerii se grupează în zonele de contact distale şi, prin legare de dimerii de pe membrana opusă, cresc suprafaţa de contact dintre membranele pre- şi postsinaptică. E vorba, deci, de un „fermoar" adeziv: după ce moleculele de adeziune constrâng celula presinaptică să nu facă sinapsă decât cu ţinte care exprimă aceeaşi moleculă de adeziune (stabilirea sinapsei) şi după ce celulele încep să aibă activitate sinaptică, moleculele de adeziune răspund la interacţiunea dintre cele două celule, fiind influenţate de semnalul potasiului, şi închid fermoarul adeziv, crescând totodată suprafaţa de contact (stabilizarea celulei) (Redies, 2000; **Fig. 4.12).** Expresia moleculelor de adeziune este modulată şi de modificări ale excitabilităţii celulei, cum ar fi potenţarea de lungă durată (LTP), caz în care căderinele ar putea reprezenta adevăraţi senzori de suprafaţă ai activităţii electrice (Ranscht, 2000).

Fig. 4.12 *Modele ale interacţiunii căderinelor la nivelul sinapsei („fermoar sinaptic"). A, rânduri paralele de dimeri de căderine pe membranele pre- şi postsinaptică flanchează zona activă şi densitatea postsinaptică pentru aforma joncţiuni strânse în jurul fantei sinaptice. B,*

*şirurile paralele de dimeri de căderine se întrepătrund şi se cuplează prin domeniul lor extracelular pentru a forma complexe de adeziune. Detaliul central, de jos, indică scala de mărime a unui dimer de căderină (*Adaptat după Ranscht, 2000. cu permisiunea autoarei)

În timpul creşterii şi sinaptogenezei, neuronii sintetizează molecule numite ganglioside *(gangiioside)* care sunt glicosfmgolipide care conţin acid stalic (pentru detalii biochimice, vezi: Margolis & Margolis, 1989, pp. 1 – 42). Sinteza de ganglioside pare să fie specifică fazei I a creşterii neuronului (invităm cititorul să* revină, dacă este nevoie la fazele descrise în paragraful anterior, propuse de H. Cline şi colaboratorii). K. Hirschberg şi colaboratorii (1996) au arătat că sinteza de

ganglioside este specifică axonogenezei, adică creşterii rapide şi diferenţierii axonului din timpul fazei I, dar nu şi creşterii arborelui dendritic şi sinaptogenezei. Oricum, acesta este doar un marker pentru că inhibarea sintezei acestei molecule nu blochează axonogeneza, dar împiedică formarea colateralelor axonale. Iată, deci, o clasă de molecule cu o perioadă de sinteză specifică unui proces de dezvoltare neuronală (Hischberg & colab., 1996).

Molecule implicate efectiv în sinaptogeneză sunt sinapsinele şi sinaptotagmina, molecule asociate, în sinapsa matură, veziculelor sânaptice (Greengard & colab., 1993). Majoritatea cercetărilor privind localizarea subcelulară şi rolul acestor molecule în dezvoltarea sistemului nervos au fost efectuate de echipa lui P. Greengard, unul din laureaţii Premiului Nobel pentru Fiziologie şi Medicină în anul 2000. Clasa sinapsinelor conţine trei molecule, sinapsinele I şi II fiind codate de două gene care produc cate. două izoforme ale proteinelor (sinapsinele Ia, b, IIA, b); sinapsina III a fost identificată mai recent (Kao & colab., 1998).

Faţă de alte molecule asociate veziculelor sinaptice, sinapsinele se disting prin faptul că sunt molecule localizate mai frecvent periferic, deci, nu sunt proteine membranare şi sunt specifice sistemului nervos, neavând un omolog identificat în cazul altor celule non-neurale. Rolul acestor molecule în sinaptogeneză a fost evident odată cu injectarea lor la un embrion în fază de blastomer la care s-a putut apoi observa accelerarea semnificativă a sinaptogenezei (Valtorta & colab., 1995). Reprimarea sinapsinelor I şi II duce la blocarea sinaptogenezei în

neuronii hipocampici (Chin & colab., 1995). Sinapsina II este implicată în extinderea inițială a proceselor nediferențiate ale neuronilor, făcând trecerea de la faza I la faza II de creştere neuronală, în timp ce sinapsina I are un rol mai specific în creşterea şi diferenţierea axonului (Ferreira & colab., 1998). Sinapsina III este şi mai specifică: ea este exprimată mai ales în conurile de creştere, iar reprimarea acesteia blochează alungirea rapidă a axonului (Ferreira & colab., 2000). Mecanismul probabil prin care sinapsinele Influenţează aceste procese de creştere este sugerat de faptul că toate trei tipurile de sinapsine au un domeniu de cuplare specific pentru actină (Kao & colab., 1998).

Sinaptotagminele sunt considerate în mod clasic o categorie de molecule asociate veziculelor sinaptice. Această clasă cuprinde cel puţin 12 proteine, cu domeniu de cuplare pentru calciu. Se consideră ca sinaptotagminele, mai ales sinaptotagminele I şi II, au rol în eliberarea rapidă a neurotransmiţătorului la nivelul sinapselor. Reprimarea genelor care codează aceste proteine nu elimină posibilitatea existenţei unor sinapse funcţionale, la care neurotransmiţătorul să fie eliberat, dar, la aceste sinapse, pragul de eliberare a neurotransmiţătorului este mai mare. Sinaptotagmina I este exprimată mai ales în celulele din zonele rostrale, iar sinaptotagmina II în regiunile caudale ale creierului; localizarea lor subcelulară este la nivelul veziculelor sinaptice. Ambele molecule au rol de senzor al calciului pentru eliberarea neurotransmiţătorului. Studii mai recente arată că sinaptotagminele III şi VI, atipice pentru clasa din care fac parte, sunt localizate mai mult la nivelul membranei neuronale, deşi ambele au un rol încă neelucidat în

sinaptogeneză pentru că expresia lor creşte semnificativ în perioada corespunzătoare acestui proces. Deci nu toate sinaptotagminele sunt molecule asociate veziculelor sinaptice, dar, cum şi acestea au domenii de cuplare pentru la „T, se sugerează că: „[...] funcţia terminalelor nervoase trebuie să implice alte căi de trafic reglate de Ca-*, încă neidentificate, dar care implică aceste sinaptotagmine". (Butz & colab., 1999, pp. 18285)

Mecanismele moleculare ale sinaptogenezei au fost investigate şi în cazul joncţiunii neuromusculare, sinapsa dintre un neuron şi efectorul său muscular, la *Drosophila,* Avantajul acestui sistem experimental este că, în stadiile embrionar şi larval, insecta prezintă

fibre musculare pe care proiectează neuroni identificabili din sistemul nervos central ventral. Sinapsa neuromusculară este glutamatergică, un neurotransmiţător comun pentru sistemul nervos central al vertebratelor.

Vom vorbi puţin despre sinaptogeneză la *Drosophila,* pentru a trece mai apoi la unele gene implicate în sânaptogeneză la această insectă. Procesul sinaptogenetic prin care sunt produse joncţiunile neuromusculare se produce gradual deja musculatura dorsală spre cea ventrală (Broadie & colab., 1993). În timpul acestui val de sinaptogeneză, conurile de creştere contactează numeroase ţinte, formându-se sinapsele tipice în urma unui proces de tip „încercare şi eroare". Dinamica acestor conuri de creştere este atât de rapidă, încât ele se pot extinde şi retrage pe întreaga suprafaţă a unui muşchi într-o perioadă de câteva minute (Rheuben, Yoshihara & Kidoko.ro, 1999). Filopodiile se stabilizează şi se diferenţiază sub forma arborizaţiei cu butoni terminali. În acelaşi timp, este asamblat sistemul presinaptic, proces care pare să fie independent de interacţiunea funcţională cu ţinta postsinaptică.

Sinapsele neuromusculare de la *Drosophila* conţin o reţea de material electrondens asociat cu membrana postsinaptică, reţea compusă din molecule care mediază interacţiunea sinaptică, cum ar fi receptori, molecule de adeziune, molecule membranare (Prokop, 1999). La nivelul terminaţiilor sub formă de buton ale arborizaţiei terminale se pot observa structuri presinaptice numite intuitiv „bare în T" *(„T-bars"),* în jurul cărora se grupează veziculele cu neurotransmiţător. Este foarte probabil ca aceste structuri să facă mai mult decât să marcheze zona activă, participând la solidarizarea, eliberarea şi/sau reciclarea veziculelor presinaptice (pentru o sinteză, vezi: Prokop & colab., 1996). După contactul terminalului presinaptic cu ţinta postsinaptică, receptorii postsinaptici încep să se aglomereze în densitatea postsinaptică. Gruparea şi funcţionalitatea acestor receptori este dependentă de activitatea sinaptică întrucât aceasta poate fi prevenită prin blocarea farmacologică sau genetică a potenţialelor de acţiune (Broadie & Bate, 1993). Foarte interesant este că şi supraexprimarea unor receptori glutamatergici la nivelul ţintei postsinaptice determină creşterea şi ramificarea terminalului presinaptic, ceea ce sugerează că activitatea electrică postsinaptică ar putea fi comunicată celulei postsinaptice pentru a regla nivelul şi

localizarea receptorilor, în timp ce creşterea numărului de receptori ar putea determina retrograd creşterea numărului de zone active ia nivelul butonului cu care face sinapsă (Stewart & colab., 1996) Dacă afinitatea receptorilor este redusă prin manipulare farmacologică sau genetică în

perioada sinaptogenezei, celula presinaptică creşte compensatoriu cantitatea de neurotransmiţător eliberată (Davis & Goodman, 1998). După aceste evenimente, funcţionarea sinapsei se rafinează, astfel că probabilitatea celulei postsinaptice de a afişa modificări ale excitabilităţii specifice sinapselor adulte, cum ar fi augmentarea, facilitarea sau potenţarea, creşte gradual (pentru detalii, vezi: Kandei, 1979; Olteanu, Lupu & Miu, 2001, pp. 293 – 296).

Mutageneze efectuate la linii de *Drosophila* la care formarea joncţiunii neuromusculare este defectivă au indicat unele gene cu rol direct în sinaptogeneză, cum ar fi gena glutamat decarboxilazei (GAD, *glutamate decarboxylase)* şi o subunitate a complexului de replicare (ORE, *origin replication complex)* (Featherstone & colab., 2000). Astfel de gene cu rol în sinaptogeneză sunt cele care codează molecule ca sinaptobrevina, neurexina sau molecula prospero. Se ştie că GAD catalizează transformarea acidului y-aminobutiric (GABA) din glutamat, dar ceea ce este surprinzător este faptul că sinapsa neuromusculară la *Drosophila* este glutamatergică, numai neuronii din SNC având drept neurotransmiţător GABA şi acetilcolina. Mutaţia nulă a genei GAD duce la scăderea densităţii de receptori postsinaptici glutamatergici (pentru detalii, vezi: Featherstone & colab., 2000). GAD ar putea influenţa numărul de receptori postsinaptici favorizând sinteza de GABA; acesta din urmă ar avea o influenţă neurotrofică. O altă posibilitate prin care s-ar explica rolul GAD în formarea joncţiunii neuromusculare ar presupune ca mutaţia GAD ar duce la perturbarea sinaptogenezei în SNC, efectul repercutându-se şi asupra neuronilor motori (Featherstone & Broadie, 2000). O altă posibilitate este că, catalizând transformarea glutamatului în GABA, GAD să favorizeze creşterea numărului de receptori postsinaptici, care s-a văzut că este inhibată de aplicarea locală a glutamatului.

O altă genă implicată în sinaptogeneză la *Drosophila* este numită *latheo (lat).* Această genă a fost descoperită de S. Boynton şi T. Tully în timp ce investigau fenotipurile la care s-a observat că se asociază

deficite de învăţare la sarcini de condiţionare a discriminării olfactive (*Drosophila* poate fi învăţată să evite mirosuri la care este asociat un şoc electric; vezi: Tully, 1996). Indivizii homozigoţi fedeficienţi pot reacţiona normal la mirosuri şi la şocuri electrice, dar nu pot învăţa asocierea stimului aversiv cu mirosul. Secvenţierea şi donarea genei defective la acest fenotip, e vorba de *lat,* a indicat că aceasta codează o subunitate a ceea ce se cheamă complex de replicare, care are funcţii în replicarea ADN-ului şi reglarea transcripţiei, *lat* s-a dovedit a fi implicată în proliferarea neuronală, indivizii cu mutaţii ale acestei gene prezentând o morfogeneză defectivă a corpilor spongiformi (*mushroom hodies),* structuri din SNC care mediază învăţarea olfactivă la *Drosophila.* Gena este exprimată mai ales la nivelul sinapselor din aceste structuri şi s-a observat că mutaţia acesteia se asociază cu creşterea activităţii postsinaptice prin creşterea reactivităţii calciului. Plasticitatea sinapsei este alterată la fenotipul *laf,* neputându-se observa procese ca facilitarea sau augmentarea. Aceste studii sugerează că *lat* joacă două roluri: un rol nuclear în replicarea ADN-ului şi transcripţie şi un rol citoplasmic în plasticitatea sinaptică. *lat* ar putea fi un prototip pentru o clasă de gene a căror transcripţie este reglată de.

240

dar şi influenţează modificările structurale asociate activităţii sinaptice. În acest context, tot mai mulţi autori pun problema unei semnalizări sinapsă-nucleu. Astfel, *lat* poate răspunde la factori dependenţi de activitatea sinaptică, deci, în ultimă instanţă, de stimul, cum ar fi influxul de calciu, semnalizarea mediată de moleculele de adeziune sau de un mesaj retrograd. Ca răspuns la aceste semnale, gene ca *lat* se translocă în nucleu şi, prin interacţiunea cu alte proteine ale complexului de replicare, modulează transcripţia unor gene. Într-o sinteză recentă.

D. E. Featherstone şi K. Broadie afirmă explicit, după ce trec în revistă numeroase rezultate experimentale asupra sinaptogenezei la *Drosophila,* că: „*Latheo* apare, deci, ca o legătură directă neaşteptată între plasticitatea sinaptică şi expresia genelor" (Featherstone & Broadie, 2000).

Din direcţia unui alt program de cercetare focalizat asupra plasticităţii sinapselor adulte, unul din laureaţii Nobel pentru Fiziologie şi Medicină din 2000.

E. R. Kandel, vorbeşte de sinapsă ca de un loc de conversaţie între sinapsă şi gene4. Cât de mult pot exalta gândirea noastră ştiinţifică ancorată în concepţii clasice aceste descoperiri atât de concrete care ne demonstrează că genomul trăieşte, este o parte a unui celule care se adaptează, deci, se modifică. Profităm de proximitatea acestei probleme pentru a detalia alte câteva astfel de interacţiuni dintre modificările sinaptice activitate-dependente şi genom, relevate în cazul unor forme de plasticitate sinaptică din creierul adult. Din toate acestea sperăm să rezulte că sinapsa este locul în care putem proba cel mai bine că genele nu sunt programe, ci entităţi biologice, deci, adaptative, de la un alt nivel de structurare a sistemului nervos şi a altor ţesuturi.

4.7 „Lanţul slăbiciunilor”: de la comportament la sinapsă şi genom

Este un fapt larg acceptat că plasticitatea sinapselor din sistemul nervos adult foloseşte aceleaşi mecanisme moleculare puse la treabă şi în cazul sinaptogenezei din perioada de dezvoltare. Dacă ne uităm la modul cum funcţionează sinapsa matură, s-ar putea să descoperim mecanisme care sunt valabile şi în sinaptogeneză şi am putea urmări cum acestea se formează. Totodată, confirmarea plasticităţii sinapselor mature a argumentat irefutabil caracterul adaptativ al creierului şi a dat o lovitură puternică fundamentaliştilor care susţineau caracterul mai degrabă static al reţelelor neuronale şi localizaţionismul radical, respectiv, celor de pe baricadele psihologiei rămasă în invocaţii esoterice ale unui suflet transcendental. Plasticitatea sinaptică este, înainte de toate, un program de cercetare de succes. În al doilea rând, acest program a adus în aceeaşi echipă specialişti din neuroştiinţe şi din psihologia cognitivă, rezultând un domeniu, neuroştiinţele cognitive, centrat pe problema legăturii dintre creier, procese cognitive şi comportament, nu pe specializări profesionale despărţite de limitări

Acesta este numele unui simpozion organizat de Institutul Nobel în 1998 şi patronat de E.R. Kandel.

tradiţionale ale interesului ştiinţific (vezi: capitolul 1, dar şi: Kandel, 2000). Fundamentul acestei colaborări este presupunerea că în mediul nonstaţionar, creierul şi comportamentul sunt adaptative.

După această digresiune, să stabilim mai întâi ce înseamnă

plasticitate neuronală. Plasticitatea neuronală se referă la modificările structurale adaptative care se consideră că susţin flexibilitatea comportamentală. În mod tradiţional, plasticitatea este diferenţiată de dezvoltare prin faptul că ea este o proprietate a structurilor mature, este activitate-dependentă, se desfăşoară mai rapid, iar efectele sale sunt temporare. Ne întrebăm: dacă toate efectele plasticităţii neuronale sunt temporare, a se înţelege nu lasă „urme" în creier, unde înghesuim evoluţia ontogenetică şi, în ultimă instanţă, filogenetică a creierului între structura şi activitatea sa funcţională? Un creier neadaptativ ar face o muncă sisifică şi e greu de crezut că selecţia de care vorbea Darwin să fie reprezentată de un extraterestru, şi nu un efect al modului de funcţionare a materiei vii. Mecanismul plasticităţii neuronale trebuie să îndeplinească două condiţii teoretice: modificarea trebuie să fie locală (funcţia se modifică gradual, nu se şterge!) şi trebuie să fie stabilă, pentru a nu se pierde modificările anterioare benefice din punct de vedere funcţional (Quartz, 1998).

4.7.1 Potenţarea de lungă durată

Istoria plasticităţii sinaptice a început odată cu studiile lui Ramón y Cajal care, arătând că unitatea morfologică şi funcţională a sistemului nervos este neuronul, a presupus cu clarviziune că legăturile dintre neuroni e cel mai probabil să fie segmentele modificabile ale neuronilor şi că această proprietate ar sta la baza „excelenţei funcţionale a creierului uman", în expresia sa. În 1966, T. Lomo observă că răspunsul evocat în celulele postsinaptice de stimuli electrici repetitivi (tetanizaţi), aplicaţi pe aferentă timp de 10 – 20 s rămâne adesea potenţat pentru o perioadă considerabilă (Lemo, 1966). Potenţarea răspunsului postsinaptic este dependentă de frecvenţa stimului electric, tocmai de aceea ea fiind numită iniţial potenţare de frecvenţă (Andrésen, Holmqvist & Voorhoeve, 1966). Această modificare de excitabilitate generalizată, cum a fost ea caracterizată, este un potenţial postsinaptic excitator, adică o creştere a excitabilităţii postsinaptice sub pragul de descărcare. Potenţarea produsă prin stimularea tetanică a aferentei, cu frecvenţa de 10 – 15 stimuli/s, timp de câteva secunde, determină la nivelul populaţiei neuronale o creştere a potenţialului de vârf (spike-ului) în timpul stimulării tetanizate (pentru detalii, vezi: Olteanu & Lupu, 2000, pp. 44 – 49). Această creştere a potenţialului de vârf al populaţiei de neuroni este o măsură integrativă a excitabilităţii populaţiei de celule

postsinaptice şi reflectă numărul de celule care descarcă şi sincronicitatea cu care acestea înregistrează descărcări (LOmo, 1971). Creşterea potenţialului de vârf este potenţată pentru o perioadă scurtă de 1 – 2 s, după care urmează o depresie care durează secunde până la minute. Dar, în anumite condiţii, potenţarea poate dura mai mult de 30 de minute, caz în care ea este numită potenţare de lungă durată (LTP) (Bliss & Lorno, 1973).

242

Potenţarea de lungă durată este o creştere a eficienţei transmiterii sinaptice excitatorii, care este activitate-dependentă şi de lungă durată (Bliss & Gardner-Medwin, 1971, 1973; Olteanu & colab., 2000). Deşi LTP-ul apare în celula postsinaptică, mecanismele prin care acesta se produce ar putea fi şi presinaptice. Există studii care susţin că LTP-ul se datorează facilitării eliberării neurotransmiţătorului (mecanism presinaptic), creşterii sensibilităţii postsinaptice la acţiunea neurotransmiţătorului (mecanism postsinaptic) sau ambele, producându-se, probabil, secvenţial (vezi: Bekkers & Stevens, 1990; Bliss & Collingridge, 1993).

Cercetări din ultimii zece ani au arătat că LTP-ul poate fi caracterizat mai degrabă ca o modificare a eficienţei sinaptice, decât strict ca o potenţare a răspunsului postsinaptic. LTP-ul este susţinut atât de evenimente pre –, cât şi postsinaptice, dar, poate mai important decât aceasta, este faptul că el ilustrează semnalizarea bidirecţională dintre cele două componente ale sinapsei. Sinapsa nu trebuie, deci, concepută ca un simplu compartiment de tranziţie a impulsului nervos dinspre celula presinaptică spre cea postsinaptică pentru că ea mediază atât semnalizări anterograde (pre – postsinaptic), cât şi retrograde (post→ presinaptic). Un al doilea aspect pe care îl vom detalia este semnalizarea dintre sinapsă şi nucleu, respectiv, modul cum modificările sinaptice activitate-dependente influenţează expresia unor gene.

Unul din modelele experimentale cu ajutorul căruia a fost studiat LTP-ul este menţinerea în cultură a unor secţiuni hipocampice, astfel putându-se investiga sinapsele în condiţii apropiate de cele din hipocamp *in vivo* (O'Dell, Kande! & Grant, 1991). O altă posibilitate este studierea neuronilor hipocampici disociaţi şi menţinuţi în cultură. S-a demonstrat astfel că aplicarea a trei serii de stimuli electrici de frecvenţă mare o 50 Hz) pe terminalul presinaptic produce creşterea

răspunsului sinaptic cu – 200% şi se înregistrează consecutiv potenţiale postsinaptice excitatorii în celula postsinaptică. Aceste experimente au fost efectuate în cazul sinapselor excitatoare glutamatergice dintre axonii celulelor piramidale din cortexul entorinal şi dendritele celulelor granulare din girusul dinţat (pentru detalii, vezi: O'Keefe & Nadei, 1978, pp. 117 – 118; Olteanu, Lupu & Miu, 2001, pp. 194 – 196). LTP-ul nu a depins de activarea receptorilor postsinaptici în condiţiile în care aceştia au fost blocaţi prin administrarea în cultură a unei toxine numite AP5 (Lopez-Garcia & colab., 1996).

Iniţial, se ştia că AP5 previne inducerea LTP-ului, dar, ulterior, s-a descoperit că această toxină acţionează la nivelul densităţii postsinaptice, blocând specific receptorii v-metil-D-aspartat. De aici, a rezultat că glutamatul eliberat de la nivel presinaptic prin stimularea tetanică acţionează asupra a două tipuri de receptori din densitatea postsinaptică, care fac parte din clasa complexului receptor-ionofor: receptorii 7V-metil-D-aspartat (NMDA) şi receptorii glutamat metabotropici de tip II (mGlu II) (vezi: Fig. 4.13 şi 4.14). Receptorii NMDA sunt blocaţi, în stare de repaus, de ioni de magneziu şi, pentru a se activa, trebuie să se conjuge cuplarea ligandului, glutamat sau glicină, cu variaţii ale potenţialului membranar postsinaptic. Cuplarea cuantelor de neurotransmiţător de receptorii

NMDA informează celula postsinaptică de depolarizarea celulei presinaptice. Acesta este primul control. Mai este nevoie de variaţii ale potenţialului de membrană postsinaptic pentru ca receptorii NMDA să se activeze. Dacă receptorii NMDA ar fi doar ligând-dependenţi, deci, s-ar activa numai la cuplarea glutamatului sau glicinei, celula postsinaptică s-ar putea depolariza chiar şi ca urmare a creşterii concentraţiei extracelulare a acestor liganzi. Prin canalul receptorilor NMDA intră mai ales ioni de Ca^{2+} care se cuplează de calmodulina. Calmodulina este o proteină citoplasmatică ce are patru domenii de cuplare pentru Ca^{2+}. Când patru ioni de Ca^{2+} ocupă domeniile calmodulinei, aceasta suferă o modificare conformaţională care îi permite să lege şi să modifice activitatea unor enzime. Astfel, Ca^{2+} intrat prin canalele receptorilor NMDA se cuplează de calmodulina şi activează în interiorul celulei postsinaptice mai multe enzime.

SEMNALE EXTRACELULARE ŞI TRANSMEMBRANARE

M. I
M. II
M. III
NEUROTRANSMIŢĂTORI HORMONI FLUX IONIC
1 /
Semnale intracelulare".
1 **\ X**
AMPC
GRUPC
PKA
Ca**2 +** – IP3* – PIP
DAG

dependenta calmodulnia
\ *i*
Proteine nucleare, citoplasmatice şi membranare
GENE TIMPURII

Fig. 4.13 *Sistemele de mesageri de ordinul II identificate în sistemul nervos.* ATP, adenozin trifosfat; ADPC, adenozin monofosfat ciclic; DAG, diacil glicerol; GTP, guanozin trifosfat; GRUPC, guanozin monofosfat ciclic; M, mesager; PIP, fosfatidil inozitol 4, 5-difosfat; IP3, inozitol trifosfat; PK, protein kinază; (Modificat după Brinton, 1991)

Una din enzimele activate de complexul Ca**2 +** /calmodulină este numită adenil-ciclază. Aceasta catalizează transformarea acidului adenozin-trifosforic (ATP) în adenozin-monofosfat ciclic (AMPC). Mai departe, creşterea nivelului de AMPC determină activarea protein-kinazei A (PKA). PICA este formată dintr-o subunitate catalitică şi o subunitate reglatoare. O ţintă citoplasmică a PKA sunt canalele de potasiu pe care aceasta le fosforilează şi, drept urmare, canalele se închid şi este prelungită perioada în care celula se repolarizează (Byrne & Kandel, 1996). Atunci când nivelul intracitoplasmatic de AMPC creşte, subunitatea catalitică a PKA se desprinde de subunitatea reglatoare şi se cuplează de altă enzimă, MAP-kinaza *(mitogen-activated protein-kinasis)* pentru a se putea

GTP – 1> OMPC
PK OMPo-depenăaiH Ca**2*** „" şi!
ATP. AMPC

I
PKA
Jri
PKA-Sr; PKA – Se iSii
CREB-2
— XXX
ADN-gene timpurii
J NUCLEU

Fig. 4.14 *Un model al cascadei moleculare a potenţării de lungă durată (LTP).* ATP, adenozin trifosfat; ADPC, adenozin monofosfat ciclic; GTP, guanozin trifosfat; GRUPC, guanozin monofosfat ciclic; HO, hemoxigenază; mGiu III, receptori glutamat metabotrobici de tip III; NMDA, iv-metil-D-aspartat; PK, protein kinază; NOS, NO sintază; Se, r, subunitate catalitică, respectiv, reglatoare; VN, vezicule de neurotransmiţător.

transloca în nucleul celulei. De aici începe „conversaţia" între sinapsă, care a iniţiat semnalul adus la nucleu de PKA şi anumite gene. În nucleu, complexul format de subunitatea catalitică a PKA cu MAP-kinaza activează factorul de transcripţie CREB-1 *(CAMP-response binding element).* CREB-1 are rol de activator al transcripţiei, el fiind controlat de CREB-2 care este, deci, represor al transcripţiei. CREB-1 activează o clasă de gene numite generic gene timpurii *(early genes),* cu referire la influenţa imediată pe care o au evenimentele sinaptice asupra transcripţiei acestor gene (Gass & colab., 1998; Lu, Kandel & Hawkins, 1999).

245

Intrarea Ca2 + în celulă determină, în paralel cu activarea adenil ciclazei, şi activarea unei alte enzime Ca2 + – dependente, este vorba de NO sintaza (NOS). Astfel, celula postsinaptică secretă monoxid de azot, un gaz care difuzează retrograd şi prin care i se semnalizează celulei presinaptice modificările postsinaptice (O'Dell & colab., 1991; pentru o sinteză, vezi: Hawkins, Son & Arancio, 1998). n-o va acţiona la nivel presinaptic asupra unei enzime, guanilil-ciclaza solubilă care determină creşterea nivelului intracelular de guanozin-monofosfat ciclic (GRUPC) şi, consecutiv, activarea protein-kinazei GRUPc-dependentă (Lu, Kandel & Hawkins, 1999; Arancio & colab., 2001). S-a arătat de curând că această enzimă se asociază cu două evenimente la nivelul celulei presinaptice: în primul rând, eliberarea

Ca^{2+} din depozite intracelulare; pe de altă» parte, studii imunohistochimice au documentat creşterea, odată cu activarea protein kinazei GRUPc-dependente, a imunoreactivităţii sinaptofizinei şi sinapsinei, proteine asociate veziculelor sinaptice (vezi: Son & colab., 1998). În concluzie, se consideră că activitatea sinaptică face terminalele presinaptice mai sensibile la mesageri retrograzi care difuzează dinspre celula postsinaptică.

S-a confirmat foarte recent că intrarea Ca^{2+} în celula postsinaptică se realizează şi prin activarea receptorilor mGlu II care, spre deosebire de receptorii NMDA, sunt deschişi şi în timpul potenţialului de repaus. Ca^{2+} determină activarea enzimei numită hemoxigenază (HO) care permite secreţia monoxidului de carbon (CO) în celula postsinaptică (Zhuo & colab., 1993). HO este considerată o enzimă „casnică" pentru că asigură, prin CO, o semnalizare retrogradă de tip fazic, faţă de NOS care permite semnalizarea retrogradă de tip tonic, prin NO, adică numai în timpul depolarizării celulei postsinaptice (Zhuo & colab., 1998).

Echipa lui E.R. Kandel a arătat că LTP-ul are o fază timpurie (e-LTP, *early LTP),* care poate fi indusă de o singură serie de stimuli electrici cu frecvenţa de 100 Hz, timp de o secundă şi o fază târzie (/-LTP, *late LTP),* care durează mai mult de trei ore şi care poate fi indusă de 3 – 4 serii de stimuli electrici la intervale de 5 – 10 minute (pentru detalii, vezi: Huang & Kandel, 1994). Există şi alte diferenţe între cele două tipuri de LTP, în afară de procedura de inducere şi durata. /-LTP necesită sinteza de noi proteine şi se asociază cu creşterea de noi procese şi contactarea unor sinapse suplimentare (Bailey & Chen, 1983, 1988 a, b). Extinderea de noi procese se bazează pe dinamica microfilamentelor de actină din spinii dendritici care reprezintă componenta postsinaptică. Perturbarea microfilamentelor prin administrarea unor agenţi care depolimerizează actina blochează faza târzie a LTP-ului (Krucker, Siggins & Halpain, 2000). e-LTP nu necesită decât modificarea covalentă a proteinelor preexistente. /-LTP este dependent de semnalizarea PKA, în timp ce e-LTP nu este afectată de perturbarea acestei căi de semnalizare (Huang & Kandel, 1994). Există argumente pentru ca aceste două modificări ale răspunsului sinaptic să poată fi asimilate unor etape/procese ale memoriei, cu durată diferită, ne referim aici la memoria de scurtă şi, respectiv, lungă durată (pentru o discuţie, vezi: Tully, 1996; Bailey, Bratsch & Kandel,

1996; Opere & Miu, 2001).

246

4.7.2 Semnalizarea sinapsă-nucleu

Lecţia pe care ne-o poate oferi LTP-ul se referă la rolul sinapsei. Am scris acest paragraf despre plasticitatea sinapselor mature pentru a înţelege că sinapsa mediază semnalizarea iniţiată de modificări structurale la nivelul celulei postsinaptice produse, la rândul lor, de activitatea sinaptică, şi nucleul celulei, unde este influenţată expresia unor gene (Kandel, 1989). Deci ideea semnalizării sinapsă-nucleu, sugerată de colocalizarea subcelulară la *Drosophila* a genei *latheo,* atât în sinapsă, cât şi în nucleu, este probată şi de cascada de evenimente produsă la nivelul sinapsei de către impulsul nervos (a se înţelege stimulul electric, în situaţia experimentală). Sinapsa este, deci, pe drept cuvânt, atât un loc de conversaţie între componenta presinaptică şi componenta postsinaptică, cât şi o punte care face legătura între dinamica celulei şi dinamica genelor.

Este un fapt bine probat experimental că schimbări activitate-dependente ale nivelului de calciu intracelular determină modificarea transcripţiei genelor, datorită legăturii dintre transducţia semnalului Ca^{2+} – dependent şi unii factori de transcripţie. Una din genele a căror expresie este indusă de influxul de Ca^{2+} este gena factorului de creştere derivat cerebral (BDNF). BDNF este o neurotrofină clasică, cu funcţie în supravieţuirea şi facilitarea proliferării neuronale. Receptorii săi sunt receptorul tirozin-kinazic Trk-B şi receptorul de mică afinitate pentru neurotrofine, p75. BDNF promovează supravieţuirea neuronală prin inactivarea unor componente ale cascadei apoptotice celulare, dar şi prin inducerea expresiei, consecutivă creşterii nivelului intracelular de AMPC şi activării factorului de transcripţie CREB, a genei anti-apoptotice *Bel-2.* Expresia BDNF este indusă de stimularea electrică tetanizată prin care este produs LTP-ul, de leziuni nervoase (vezi: capitolul despre mielinizare), dar şi de stimularea vizuală regulată. Deci, *BDNF* este un exemplu de genă timpurie imediată *(imediate early-gene),* adică este o genă a cărei expresie este iniţiată rapid şi fără să fie necesară sinteza de noi proteine, prin transcripţia indusă de stimul. Mai precis, *BDNF* este indusă prin modificarea posttranslaţională a factorilor de transcripţie preexistenţi. Deci, *BDNF* este un exemplu de genă a cărei expresie este indusă activitate-dependent (pentru detalii, vezi: West &

colab., 2001).

Influenţa activităţii neuronale asupra expresiei genelor poate fi sintetizată astfel: (1) asocierea dintre moleculele de semnalizare şi canalele de calciu influenţează capacitatea acestora din urmă de a promova expresia genelor; (2) stimuli diferiţi determină modificări diverse ale unor factori de transcripţie activitate-dependenţi, cum ar fi CREB; (3) expresia genelor timpurii poate.fi modulată prin acţiunea mai multor factori de transcripţie care pot fi activaţi prin căi de semnalizare intracelulară diferite.

Modularea expresiei genelor prin semnalizarea sinaptică al cărui principal actor este calciul intracelular este, deci, o teză tare a neuroplasticităţii. Din nou, concluzia este că genele sunt „vii", deci, adaptative. În acest context, genetica localizaţionistă clasică care consideră că genele sunt inflexibile, un fel de înţelept care conservă un program în furtuna vieţii celulei, este o concepţie care începe să

se modifice. Mai rămâne ca această teză să penetreze la nivelul controverselor din alte domenii decât biologia moleculară, cum ar fi psihologia dezvoltării sau neurobiologia evoluţionistă, în care există discuţii tradiţionale între nativism, care presupune că genele sunt programe stabile prin excelenţă şi cei care iau în considerare mai mult modificările produse de experienţă asupra comportamentului şi creierului. E adevărat, aceasta presupune să ne concentrăm pe a înţelege regulile după care se modifică expresia genelor, problemă mai puţin structurată decât cea tradiţională, în care căutăm gene specifice chiar şi pentru fenomene multifactoriale cum ar fi inteligenţa! Concluzia pe care o propunem este că şi expresia genelor este o funcţie a semnalizării neuronale. De aici, perspectiva unei neurofiziologii moleculare este deschisă.

4.8 Rezumat

Formarea sinapselor este un eveniment major al dezvoltării sistemului nervos. Acest proces decurge relativ sincron în toate ariile corticale. Recent, tot mai multe cercetări se concentrează asupra relaţiei dintre unele caracteristici morfologice ale sinapselor şi plasticitatea sinaptică din timpul perioadei de dezvoltare şi din perioada adultă. Evoluţia sinaptogenezei are aproximativ acelaşi aspect în toate ariile corticale, adică o perioadă de supraproducţie sinaptică, redundanţa sinaptică din această perioadă fiind pusă la baza

plasticităţii comportamentale remarcabile din perioadele timpurii de dezvoltare, urmată de o perioadă de platou cu o durată variabilă şi de o perioadă de selecţie activă a sinapselor.

Teorii clasice postulează trei stări morfo-funcţionale ale sinapselor, şi anume stabilă, labilă şi degenerativă. Mai mult, există numeroase teorii care încearcă să justifice specificitatea cu care se stabilesc sinapsele, unul din modelele cele mai consactrate fiind propus de teoria chemoafinităţii. În dezvoltarea şi asamblarea sinapselor, un rol fundamental îl au unele molecule prin care este semnalizat traseul tipic al conurilor de creştere, factori de contact şi adeziune celulară, dar şi activitatea electrică, semnificativă fiind contribuţia activităţii electrice spontane de dinainte de formarea sinapselor, la baza căreia stau joncţiunile de tranzit (gap). Mecanismele moleculare ale formării sinapselor implică mai ales unele molecule asociate veziculelor sinaptice, prezente şi în sinapsele mature, precum şi moleculele de adeziune celulară. Sinapsa este astăzi concepută nu ca pe un simplu compartiment de tranzit a semnalului nervos, ci ca pe un segment specializat pentru comunicarea bidirecţională dintre porţiunile presinaptică şi postsinaptică. Mai mult, unele forme ale plasticităţii sinaptice demonstrează semnalizarea sinapsă-nucleu, prin care este modulată expresia unor gene ca urmare a activităţii sinaptice.

248

REFERINŢE BIBLIOGRAFICE:

„Referinţe recomandate Referinţe de mare interes

Adelsberger-Mangan, D.M., Levy, W.B. (1994) *The influence of limited presynaptic growth and synapse removal on adaptive synaptogenesis.* Biol.

Cybernetics. 71, 461 – 468 Andrésen, P., Holmqvist, B., Voorhoeve, P.E. (1966) *Entorhinal activation of dentate granule cells.* Acta Physiol. Scand. 66, 448 – 460 Anglister, L., Farber, I. C, Sharar, A., Grinvald, A. (1982) *Localisation ofvoltagesensitive calcium channels along developing neurites: their possible role în regul ating neurite elongation:* Dev. Biol. 94, 351 – 365 lAoki, C. (1997) *Postnatal changes in the laminar and subcellular distribution of*

NMDA-R1 subunits in the cat visual cortex as revealed by immunoelectron microscopy. Dev. Brain Res. 98, 41 – 59 Arancio, O., Antonova, L, Gambaryan, S., Lohmann, S. M, Wood, J. S.

Lawrence, D.S., Hawkins, R.D. (2001) *Postsynaptic role of CGMP – dependent protein kinase during long-lasting potentiation.* J. Neurosci. 21.

143 – 149 Bailey, C.H., Chen, M. (1983) *Morphological basis of long-term habituation and sensitization in Aplysia.* Science 220, 91 – 93 Bailey, C.H., Chen, M. (1988 a) *Long-term memory în Aplysia modulates the total number of varicosities of single identified senzory neurons.* Porc. Natl.

Acad. Sci. USA 85, 2373 – 2377 iailey, C.H., Chen, M. (1988 b) *Long-term sensitization in Aplysia increases the number of presynaptic contacts onto the identified gill motor neuron L7.*

Porc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 9356 – 9359 „Bailey, C.H., Bratsch, D., Kandel, E.R. (1996) *Toward a molecular definition of long-term memory storage.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 13445 – 13452

O excelentă sinteză a mecanismelor moleculare care susţin LTP-ul, deşi referinţa trebuie completată cu date mai recente, dintre care cele mai reprezentative sunt oferite în acest index. Bates, E., Thal, D., Finlay, B.L., Clancy, B. (2001) Early language development and its neural correlates. În: Rapin, I., Segalowitz, S. (Eds.): *Hanbook of*

Neuropsychology. Voi. 7: *Child Neurology.* Elsevier, Amsterdam Bekkers, J.M., Stevens, C.F. (1990) *Presynaptic mechanism for long-term potentiation in the hippocampus.* Nature 346, 724 – 729 Benson, D.L., Tanaka, H. (1998) *N-cadherin redistribution during synaptogenesis în hippocampal neurons.* J, Neurosci. 18, 6892 – 6904 Bentley, D., Keshishian, M. (1982) *Pathfinding by peripheral pioneer neurons în grasshoppers.* Science 218, 1082 – 1088 Berridge, M., Irvine, R.F. (1984) *Inositol triphosphate: a novei second messenger în celular signal transduction.* Nature 312, 315 – 320

249

Berridge, M., Rapp, P. (1979) *A comparative survey of the function, mechania and control of celular oscillations.* J. Exp. Biol. 81, 217 – 280 „Black, J.E., Isaacs, K.R., Anderson, B.J., Alcantara, A.A., Greenough, W.T.

(1990) *Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity acum angiogenesis, în cerebellar cortex of adult rats.* Porc. Natl. Acad. Sci. US»

87 ţ 5568 – 5572

Un studiu excelent care demonstrează că învăţarea este

relaţionată specific ci sinaptogeneza în scoarţa cerebeloasă a şobolanilor adulţi. Bliss, T.V.P., LOmo, T. (1973) *Long-lasting potentiation of synaptic transmissk in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation oftk perforanptath.* J. Physiol. 232, 331 – 356 Bliss, T.V.P., Gardner-Medwin, A.R. (1971) *Long-lasting increases of synaptk influence in the unanaesthetized hippocampus.* J. Physiol. 216, 32 – 33 P. Bliss, T.V.P., Gardner-Medwin, A.R. (1973) *Long-lasting potentiation of.*

synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthesized rabbil following stimulation of the perforant path. J. Physiol. 232, 357 – 374 Bliss, T.V.P., Collingridge, G.L. (1993) *A synaptic model ofmemory: Long-ten potentiation in the hippocampus.* Nature 3161, 31 – 39 Bonhoffer, F., Huf, J. (1982) *In vitro experiments on axon guidance demonstratini an anterior-posterior gradient on the tectum.* EMBO J.1, 4 27 – 431 Bourgeois, J.P. (1997) *Synaptogenesis, heterochrony and epigenesis în tk!*

mammalian neocortex. Acta Ped. (Suppl.) 422, 27 – 33 Bourgeois, J.P., Goldman-Rakic, P.S., Rakic, P. (1994) *Synaptogenesis in the prefrontal cortex ofrhesus monkeys.* Cereb. Cortex 4, 78 – 96 Bourgeois, J.P., Rakic, P. (1993 a) *Changes of synaptic density in the primam visual cortex of the macaque monkey from fetal to adult stages.* J.

Neurosci. 13, 2801 – 2820 Bourgeois, J.P., Rakic, P. (1993 b) *Changes of synaptic density in the primară visual cortex of the macaque monkey from fetal to adult stages.* J.

Neurosci. 13, 2801 – 2820 Bourgeois, J.P., Rakic, P. (1996) *Synaptogenesis in the oocipital cortex of macaque monkey devoid ofretinal imputfrom early embryonic stages.* Eur!

J. Neurosci. 8, 942 – 950 Bourgeois, J: P., Jastreboff, P.J., Rakic, P. (1989) *Synaptogenesis în visual cortex* I

of normal and preterm monkeys: evidence for intrinsic regulation of synaptic overproduction. Porc. Nat! Acad. Sci. USA 86, 4297 – 4301 Bray, D. (1979) *Mechanical tension produced by nerve cells în tissue culture.* J,!

Cell. Sci. 37, 391 – 410 Bray, D., Chapman, K. (1985) *Analysis of microspike movements on the neuronal*

growth cone. J. Neurosci. 12, 3204 – 3213 Brinton, R.E. (1991) Biochemical correlates of learning and memory. În: Martínez

Jr., J.L., Kesner, R.P. (Eds.): *Learning and Memory. A Biological Viev/%*

(pp. 199 – 258). Academic Press, San Diego Broadie, K., Bate, M. (1993) *Innervation directs receptor synthesis and*j *localization in Drosophila embryo synaptogenesis.* Nature 361, 350 – 353

250

Broadie, K., Sink, H., Van Vactor, D., Fambrough, D., Whitington, P.M., Bate.

M., Goodman, C.S. (1993) *Front growth cone to synapse: The life history of the RP3 motor neuron.* Development (Suppl.) 120, 227 – 238 Butz, S., Fernandez-Chacon, R., Schmitz, F., Jahn, R., Siidhof, T.C. (1999) *The subcellular localizations of atypical synaptotagmins III and VI.* J. Biol.

Chem. 274, 18290 – 18296 Byrne, J.H., Kandel, E.R. (1996) *Presynaptic facilitation revisited: State andtime dependence.* J. Neurosci 16, 425 – 435 Calverley, R.K.S., Jones, D.G. (1990) *Contributions of dendritic spines and perforated synapses to synapticplasticity.* Brain. Res. Rev. 15, 215 – 249 Campenot, R. (1977) *Local control ofneurite development by nerve growth factor.*

Porc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4516 – 4519 Castro-Alamancos, M.A., Connors, B.W. (1997) *Distinct forms of short-term plasticity at excitatory synapses of hippocampus and neocortex.* Porc. Natl.

Acad. Sci. USA 94, 4161 – 4166 Caveney, S. (1985) *The role of gap junctions in development.* Annu. Rev. Physiol.

47, 319 – 335 Cahngeux, J.P. (1983) *Concluding remarks on the singularity of nerve cells and its ontogenesis.* Prog. Brain Res. 58, 465 – 478

Changeux, J.P. (1985) *Neuronal Man.* Pantheon Books, New York „Changeux, Courrege, P., Danchin, A. (1973) *A theory of the epigenesis of neural*. *networks by selective stabilization of synapses.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA

70, 2974 – 2978

Un model teoretico-experimental clasic al sinaptogenezei. Changeux, Courrege, P., Danchin, A., Lasry, J.M. (1981) *Un mecanisme biochimiquepour l'epigenese de lajonction neuromusculaire.* C.R. Acad.

Sci. Paris 292, 449 – 453 Changeux, J.P., Danchin, A. (1976) *Selective stabilization of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks.* Nature 264.

705 – 712 „Chin, L.-S., Li, L., Ferreira, A., Kosik, K.S., Grengard, P. (1995) *Impairment of axonal development and synaptogenesis în hippocampal neurons of synapsin I-deficient mice.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 9230 – 9234

Sinapsina I participă la diferenţierea xonului şi la sinaptogeneză, fapt susţinut de aspectul deficitar al acestor procese la linia transgenică de şoareci la care expresia genei sinapsinei 1 a fost blocată. Churchland, P.S., Sejnowski, T.J. (1996) *The Computaţional Brain.* MIT Press.

Cambridge Clancy, B., Darlington, R.B., Finlay, B.L. (2000) *The course of human events:*

predicting the timing of primate neural development. Dev. Sci. 3, 1, 57 – 66 Câine. H.T. (2001) *Dendritic arbor development and synaptogenesis.* Curr. Opin.

Neurobiol. 11, 118 – 126

O sinteză a datelor recente asupra mecanismelor care controlează dinamica arborelui dendritic.

251

Cline, H.T., Edwards, J.A., Rajan, L, Wu, G. Y" Zou, D.J. (1999) *In vivo imaging oflNS neuron development.* Cold Spring Harbor Lab., New York Cohen, C.S., Haydon, P.G., Kater, S.B. (1985) *Single channel activity differs în growing and nongrowing growth cones of isolated identified neurons of*

Helisoma. J. Neurosci. res. 13, 285 – 300 Connolly, J.L., Seeley, P.J., Greene, L.A. (1985) *Regulation of growth cone morphology by nerve growth factor: A comparative study by scanning electron microscopy.* J. Neurosci. res. 13, 183 – 198 Cooper, **M.W., Smith,** S.**J. (1992)** *A real-time analysis of growth cone-target cell interactions during the formation ofstable contacts between hippocampal neurons în culture.* J. Neurobiol. 23 „814 – 828 Cotman, C.W., Monaghan, D.T., Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J. (1987)

Anatomică! organization of ecitatory amino-acid recptors and their pathways. Trends. Neurosci. 10, 273 – 279 Cottrell, J.R. Dube, G.R., Egles, C, Liu, G. (2000) *Distribution, density, and clustering of funcţional glutamate receptors before and after synaptogenesis în hippocampal neurons.* J. Neurophysiol. 84, 1573 – 1587 Cowan, W. M. (1979) *The development of the brain.* Sci. Am, 241, 106 – 117 Dale, H.H. (1936) *Some recent extensions of the chemical transmission of the effects of*

nerve impulses. Physiol. Med. (Prelegere Nobel) Davis, G.W., Goodman, C.S. (1998) *Synapse-specific control ofsynaptic efficacy at the terminals of a single neuron.* Nature 392, 82 – 86 DeRobertis, E., Bennett, H.S. (1954) *Submicroscopic vesicular component in the synapse.* Fed. Porc, 13, 35 Desmond, N.L., Levy, W.B. (1988) *Synaptic interface surface area increases with lon-termpotentiation in the dentate gyrus.* Brain Res. 453, 308 – 314 **Dodd,** J., Jessell, T.M. (1985) *Lactoseries carbohydrates specify subsets of dorsal root ganglion neurons projecting to the superficial dorsal horn of rai spinal cord.* J. Neurosci. 5, 3278 – 3294 Dunaevsky, A., Tashirō, A., Majewska, A., Mason, C, Yuste, R. (1999)

Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous sistem. Porc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 13438 – 13443 Easter. S.S. Jr., Purves, D., Rakic, P., Spitzer, N.C. (1985) *The changing view of neural specificity.* Science 230, 507 – 511 Eccles, J.C. (1982) *The synapse: from electrical to chemical transmission.* Annu.

Rev. Neurosci. 5, 325 – 339

Edelman, G.M. (1982) *Cell adhesion molecules.* Science 219, 450 – 457 Elman, J., Bates, E., Johnson, M., Karmiloff-Smith, A., Parisi, D., Plunkett, K.

(1996) *Rethinking înnateness: A connectionispterspective on development.*

MIT Press/Bradford Books, Cambridge Fannon, A.M., Coiman, D.R. (1996) *A model for central synapâic funcţional complex formation based on the differenţial adhesive specificities of the cadherins.* Neuron 17, 423 – 434

252

Featherstone, D.E., Broadie, K. (2000) *Surprises from Drosophila: Genetic mechanisms of synaptic development andplasticity.* Brain Res. Bull. 53.

501 – 511

Descrierea unor mecanisme moleculare care contribuie la sinaptogeneza la

Drosophila. Featherstone, D.E., Rushton, E.M., Hilderbrand-Chae, M., Phillips, A. ML.

Jackson, F.R., Broadie, K. (2000) *Presynaptic glutamic acid decarboxylase (GAD) is requiredfor induction of the postsynaptic receptor field at a glutamatergic synapse.* Neuron 27, 71 – 84 Feller, M.B., Butts, D.A., Aaron, H.L., Rokhsar, D.S., Shatz, G.J. (1997)

Dynamic processes shape spatiotemporal properties of retinal waves.

Neuron 19, 293 – 306 Feng, Z.P., Klumperman, J., Lukowiak, K., Syed, N.I. (1997) *In vitro synaptogenesis between the somata ofidentifiedlymanea neurons requires protien synthesis but not extrinsic growth factors or substrate adhesion molecules.* J. Neurosci. 17, 7839 – 7849 Ferreira, A., Chin, L.S., Li, L., Lanier, L.M., Kosik, K.S., Greengard, P. (1998)

Distinct roles of synapsin I and synapsin II during neuronal development.

Mol. Med. 4, 22 – 28 Ferreira, A., Kao, H.-T., Feng, J., Rapoport, M., Greengard, P. (2000) *Synapsin*

III: Developmental expression, subcellular localization, and role în axon formation. J. Neurosci. 20, 3736 – 3744

Descrierea expresiei şi localizării subcelulare a sinapsinei III, ce! mai recent identificată moleculă din familia sinapsinelor. „Fiala, J. C, Feinberg, M., Popov, V., Harris, K.M. (1998) *Synaptogenesis via dendritic filopodia în developing hippocampal area CAI.* J. Neurosci. 18.

8900 – 8911

Un foarte frumos studiu electronmicroscopic al dezvoltării dendritelor şi sinaptogenezei, cu accent asupra rolului filopodiilor dendritice în facilitarea contactării de noi sinapse şi diferenţierea spinilor dendritici. Fitzsimonds, R.M., Poo, M.M. (1998). *Retrograde signaling in the development and modification ofsynapses.* Physiol. Rev. 78, 143 – 170 Flechsig, P. (1920) *Anatomie des menshlichen Geims und Ruckenmarks auf myelogenetischer Grundiage.* Thieme, Leipzig Foucaud, B., Reeb, B., Sensenbrenner, M., Gombos, G. (1982) *Kinetic and morphological analysis of the preferenţial adhesion of chick embryo neuronal cells to astroglial cell în culture.* Exp. Cell. Res. 137, 285 – 294 Fraser, S.E. (1985) Cell interactions involved în neuronal patterning: An experimental and teoretical approach. În: Edelman, G.M., Gali, W. E.

Cowan, W.M. (Eds.): *Molecular bases of neural development.* Wiley.

New York Fredette, B.J., Ranscht, B. (1994) *T-cadherin expression delineates specific regions of the developing motor axon-hindlimb projection pathway.* J.

Neurosci. 14, 7331 – 7346

Fredette, B.J., Miller, J., Ranscht, B. (1996) *Inhibition of motor axon growth by Teadherin substrata.* Development 122, 3163 – 3171 Frotscher, M. (1989) Central cholinergic synapses: the septohippocampal sistem as a model. În: Frotscher, M., Misgeld, U. (Eds.): *Central cholinergic synaptic transmission* (pp. 33 – 41). Birkhäser, Basel Galii, L., Maffei, L. (1988) *Spontaneous impulse activity ofrat retinal ganglion cells în prenatal life.* Science 242, 90 – 91

Unul din primele studii care demonstrează existenţa activităţii electrice sponatne în retina embrionară. Gass, P., Wolter, D.P., Balschun, D.; Rudolph, D., Frey, U., Lipp, H.P., Schutz.

G. (1998) *Deficits în memory tasks of mice with CREB mutations depend on gene dosage.* Learn. Mem. 5, 274 – 288 Gaze, R.M., Keating, M.J., Ostberg, A., Chung, S.H. (1979) *The relationship between retinal and tectal growth în larval Xenopus: Implications for the development of the retino-tectal projections.* J. Embryol. Exp. Morph. 53.

103 – 143 Gaze, R.M., Sharma, S.C. (1970) *Axial differences in the reinnervation of the goldfish optic tectum by regenerating optic nerve fibers.* Exp. Brain. Res.

10, 171 – 181 Goldman-Rakic, P.S., Brown, R.M. (1982) *Postnatal development of monoamine content and synthesis in the cerebral cortex ofrhessus monkeys.* Brain Res.

256, 339 – 349 Goodman, C.S., Shatz, C.J. (1993) *Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity.* Cell (Suppl.) 72, 77 – 98 Gottlieb, D.I., Glaser, L. (1981) Celular recognition during neural development.

În: Cowan., W.M. (Ed.): *Studies în developmental neurobiology (*pp. 243

260). Oxford University Press, Oxford Greengard, P., Valtorta, F., Czernik, A.J., Benfenati, F. (1993) *Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function.* Science 259, 780 – 785 „Greenough, W.T., Chang, F.-L. F. (1988) *Dendritic pattern formation involves both oriented regression and oriented growth in the barrels of mouse somatosensory cortex.* Dev. Brain Res. 43, 148 – 152

În această cercetare, autorii lansează ideea de câmp dendritic, care presupune ca orientarea arborelui dendritic să fie preferenţial în direcţia în care contactează sinapse şi primeşte, deci, inputuri. O confirmare modernă a principiului polarităţii neuronale a lui Ramón y Cajal. Greenough, W.T., Black, J.E., Wallace, C.S. (1996) Experience and

Brain
Development. În: Johnson, M.J. (1996): *Brain Development and Cognition* (pp. 291 – 322). Blackwell Publishers LTD, Oxford Grumet, M., Hoffman, S., Crossin, K.L., Edelman, G.M. (1985) *Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and non-neural tissues that mediat es glia-neuron interaction.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 8075 – 8079 Hamburger, V. (1970) Embryonic mobility în vertebrates. În: Schmitt, F.O. (Ed.):
The Neurosciences: Second study program. Rockefeller University Press.
New York
254
Harris. K.M., Jensen, F.E., Tsao, B. (1992) *Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses în rat hippocampus (CAI) at postnatal day*
15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. J. Neurosci. 12, 2685 – 2705 Harris. K.M., Kater, S.B. (1994) *Dendritic spines: celular specializations imparting both stability and flexibility to synpatic functions.* Annu. Rev.
Neurosci. 17, 341 – 371 Harrison, R.G. (1907) *Observations on the living developing nerve fiber.* Anat.
rec. 1, 116 – 118 „Harrison, R.G. (1914) *The reaction ofembryonic cells to solid structures.* J. Exp.
Zool. 17, 521 – 544
Unul din primele studii pe culturi de neuroni, prin care s-a arătat că substratul solid este necesar pentru supraviețuirea celule*lor in vitro.* Hawkins, R.D., Son, H., Arancio, O. (1998) *Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus.* Prog. Brain Res.
118, 155 – 172 „Haydon, P.G. (1988) *The formation of chemical synapses between cell cultured neuronal somata.* J. Neurosci. 8, 1032 – 1038
Descrierea modelului experimental al juxtapunerii corpurilor celulare a doi neuroni, care fac sinapse chimice şi electrice. Haydoti, P.G., Drapeau, P. (1995) *From contact to connection: early events during synaptogenesis.* Trends. Neurosci. 18, 196 – 201 Hirschberg, K., Zisting, R., van Echten-Deckert, G., Futerman, A.H. (1996)
Ganglioside synthesis during the development of neuronal polar

ity. J. Biol.
Chem. 271, 14876 – 14882
Sinteza de ganglioside este specifică fazelor de diferenţiere a axonului
(axonogeneză), dar nu şi celor în care se dezvoltă arborele dendritic. Hokfelt, T., Holets, V.R., Staines, W., Meister, B., Melander, T., Schalling, M.
Schultzberg, M., Freedman, J., Bjorklund, H., Olson, L., Lindk, B., Elfvin.
L. G., Lundberg, J., Lindgren, J.A., Samuelsson, B., Terenius, L., Post, C.
Everitt, B., Goldstein, M. (1986) *Coexistence of neuronal messengers: An overview.* Prog. Brain Res. 68, 33 – 70 Huang, Y.-Y., Kandel, E.R. (1994) *Recruitment of long-lasdng andprotein-kinase*
A-dependent long-term potentiation in the CAI region of the hippocampus requires repeated tetanization. Learn. Mera. 1, 74 – 82 Huttemlocher, P.R. (1979) *Synaptic density în hwnan frontal cortexdevelopmental changes and efects ofaging.* Brain Res. 163, 195 – 205 Huttenlocher, P.R. (1990) *Morphometric study of human cerebral cortex development.* Neuropsychologia 28, 517 – 527 Huttenlocher, P.R., Dabholkar, A.S. (1997) *Regional differences în synaptogenesis in human cerebral cortex.* J. Comp. Neurol. 387, 167 – 178 Jacobs, K., Todman, M.G., Alien, M.J., Davies, J.A., Bacon, J.P. (2000)
Synaptogenesis in the giant-fibre systern of Drosophila: interaction of the giant fibre and its major motorneuronal target. development 127, 5203
5212
255
Jacobson, M. (1968) *Development of neuronal specificity în retinal ganglion cells of Xenopus.* Dev. Biol. 17, 202 – 218 Jessell, T.M., Kandel, E.R. (1993) *Synaptic transmission: a bidirecţional and selfmodifiable form of cell-cell communication.* Cell/Neuron 72 (Suppl), 1 – 30 Johnston, R.N., Wessels, N.K. (1980) Regulation of the elongating nerve fiber. În:
Current topics în Developmental Biology, Voi. 16, *Neural Development.*
Partea a II-a, *Neural Development în Model Sistems* (pp. 165 – 206).

Academic Press, New York Jones, D.G., Calverley, R. (1991) *Perforated and non-perforated synapses în rat neocortex: three-dimensional reconstruction.* Brain Res. 556, 247 – 258 Kaech. S., Parmar, H., Roelandse, M., Bommann, C, Matus, A. (2001)

Cytoskeletal microdifferentiation: A mechanism for organizâng morphological plasticity în dendrites. Porc. Natl. Acad. Sci. USA 98.

7086 – 7092

Kandel, E.R. (1979) *Small sistems of neurons.* Sci. Am. 241, 60 – 77 Kandel, E.R. (1989) *Genes, nerve cells, and the remembrance of things past.* J.

Neuropsychiatry Clin. Neurosci. 1, 103 – 125 Kandel, E.R. (2000) *Neuroscience: Breaking down scientific barriers to the study of brain and mind.* Science 290, 1113 – 1121 Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (1991) *Principles of neural science.*

Appleton & Lange, Norwalk Kanno, Y., Loewenstein, W.R. (1964) *Intercelhdar diffusion.* Science 143, 959

960 Kao, H.-T., Porton, B., Czernik, A.J., Feng, J., Yiu, G., Hărig, M., Benfenati, F.

Greengard, P. (1998) *A third member of the synapsin gene family.* Porc.

Natl. Acad. Sci. USA 95, 4667 – 4672 Katz, B. (1970) *On the quantal mechanism of neural transmitter release.* Physiol.

Med. (Prelegere Nobel), 485 – 492 Katz, L. C, Constantine-Paton, M. (1988) *Relationship between segregated afferents and postsynaptic neurons in the optic tectum of three-eyed frogs.*

J. Neurosci. 8, 3160 – 3180 Koch, A.W., Bozie, D., Pertz, O., Engel, J. (1999) *Homophilic adhesion by cadherins. Cxxn.* Opin. Struct. Biol. 9, 275 – 281 Krucker, T., Siggins, G.R., Halpain, S. (2000) *Dynamic actin fdaments are required for ştab le long-term potentiation (LTP) în ar ea CAI of the hippocampus.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 6856 – 6861 Kuwada, J.Y. (1986) *Cell recognition by neuronal growth cones în a simple veretebrate embryo.* Science 233, 740 – 746 „Letourneau, P. C. (1975) *Neuronal growth cones.* Annu. Rev. Physiol. 45, 567

580

O sinteză timpurie a datelor despre mecanismele care controlează motilitatea conului de creştere neuronal. Letourneau, P. C. (1979) *Cell substratum adhesion of neuritic growth cones, and its role în neurite elongation.* Exp. Cell. Res. 124, 127 – 138

256

Letourneau, P.C. (1981) *Immunocytochemical evidence for colocalisation in neurite growth cones of actin ană myosin and their relationship to cell substratum adhesion,* Dev. Biol. 85, 113 – 122 Letouroeau, P.C. (1982) Nerve fiber growth and its regulation by extrinsic factors.

În: Spitzer, N.C. (Ed.): *Neuronal Development* (pp. 213 – 254). Plenum

Press, New York Levi-Montalcini, R. (1964) *Growth control of nerve cells by a protein factor and its antiserum.* Science 143, 105 – 110

Primul articol în care Levi-Montalcini expune rolul NGF asupra motilităţii neuronilor. Levi-Montalcini, R., Angeletti, P.U. (1961) *Growth control of the sympathetic sistem by a specific protein factor,* **Quart. Rev. Biol. 36, 99 – 108** Levi-Montalcini, R., Cohen, S. (1960) *Efects of the extract of the mouse submaxillary salivary glands on the sympathetic sistem of mammals.* Ann.

N. Y. Acad. Sci. 85, 324 – 341 „Levi-Montalcini, R., Hamburger, V. (1953) 4 *diffusible agent of mouse sarcoma, producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo.* J. Exp. Zool. 123, 233 – 288

Prima descriere a NGF. Levinthal, F., Macagno, E., Levinthal, C. (1976) *Anatomy and development of identified cells în isogenic organisms.* Cold Spring Harbor Symp. Quant.

Biol. 40, 321 – 332 „Lidow, M.S., Goldman-Rakic, P.S., Rakic, P. (1991) *Synchronized overproduction of neurotransmitter receptors în diverse regions of the primate cerebral cortex.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10218 – 10221

Un studiu în care s-a estimat că producerea de receptori GABA-ergici, dopaminergici, adrenergici, serotoninergici şi colinergici în celulele din diverse arii corticale este relativ sincronizată cu sinaptogenza. Lidow. M.S., Rakic, P. (1995) *Neurotransmitter receptors in the proliferative zones of the developing primate occipital lobe.* J. Comp. Neurol. 360, 393

402 Llinas, R., Baker, R., Sotelo, C. (1974) *Electrotonic coupling between neurones în cât inferior olive.* J. Neurophysiol. 37, 560 – 571 „Loewi, O. (1921) *Über umorale Übertragharkeit der Herznervenwirkung.*

Pflügers Arch. Gesamte Physiol. 189, 239 – 242

Primul articol în care este probat mecanismul cuantic de transmitere la nivelul sinapselor neuromusculare. Loewi. O. (1936) *The chemical transmission of nerve action.* Physiol. Med.

(Prelegere Nobel) Lomo, T. (1966) *Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in the dentate area of the hippocampal formation.* Acta Physiol. Scand. 68

(Suppl.277), 128 LOmo, T. (1971) *Patterns of activation in a monosynaptic cortical pathway: the perforant path imput to the dentate area of the hippocampal formation.*

Exp. Brain Res. 12, 18 – 45

257

Lopez-Garcia, J. C, Arancio, O., Kandel, E.R., Baranes, D. (1996) *A presynaptic locus for long-term potentiation of elementary synaptic transmission at mossyfiber synapses în culture* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 4712 – 4717 Lo Turco, J, J., Kriegstein, A.R. (1991) *Clusters of coupled neuroblasts în mebryonic neocortex.* Science 252, 563 – 566 Lo Turco, J.J., Kriegstein, A.R. (1995) Neurotransmitters signaling before the birth of neurones. În: Gutnik, M.D., Mody, I. (Eds.): *The cortical neuron*

(pp. 197 – 209). Oxford University Press, Oxford Lu, Y.-F., Kandel, E.R., Hawkins, R.D. (1999) *Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorilation in the hippocampus.* J.

Neurosci. 23, 10250 – 10261 Lund, J.S., Holbach, S.M. (1990) *Postnatal development of thalamic recipient neurons in the monkey striate cortex: I. Comparison ofspine acquisition and dendritic growth oflayer 4C alpha and beta spiny stellate neurons.* J.

Comp. Neurol. 309, 115 – 128 Macagno, F., Lopresti, U., Levinthal, C. (1973) *Structural development of 'neuronal connections in isogenic organisms: Variations and similarities in the optic tectum of Daphnia magna.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 57 – 61 Mackenzie, P., Kenner, G., Prange, O., Shayan, H., Umemiya, M., Murphy, T.

(1999) *Ultrastructure correlates of quantal synaptic function at single CNS*

synapses. J. Neurosci. 19 RC13, 1 – 7 MacNeil, M.A., Masland, R.H. (1998) *Extreme diversity among amacrine cells:*

Implications for function. Neuron 20, 971 – 982 „Magoski, N.S., Bulloch, A.G.M. (1998) *Trophic and contact conditions modulate synapse formation between identifled neurons.* J. Neurophysiol.

79, 3279 – 3283

Experimente în care se arată că perikarionii a doi neuroni pot face sinapse doar în prezenţa unui mediu de cultură bazai, care conţine, probabil, factori trofici care facilitează sinaptogeneza şi în condiţii de contact celular. Maineh, Z.F., Sejnowski, T.J. (1996) *Influence of dendritic structure on firing pattern în model neocortical neurons.* Nature 382, 363 – 366 Margolis, R.U., Margolis, R.K. (1989) *Neurobiology of Glycoconjugates.* Plenum

Press, New York Marinescu, G. (1895) *Theorie des neurones. Application au processus de degenerescence et d'atrophie dans le sisteme nerveux.* La Presse

Medicale, 3, 812

Marinescu, G. (1909) *La celule nerveuse* (vol. 1). Doin, Paris Markus, E.J., Petit, T.L. (1989) *Synaptic structural plasticity: role of synaptic shape.* Synapse 3, 1-11 Marrone, D.F., Petit, T.L. (2002) *The role of synaptic morphology în neural plasticity: structural interactions undelying synaptic power.* Brain Res.

Rev. 38, 291 – 308

Una din cele mai recente sinteze asupra legăturii dintre morfologia şi tipul de sinapsă cu plasticitatea sinaptică din timpul dezvoltării sistemului nervos şi din sistemul nervos adult.

258

Matsunaga, M., Hatta, K., Nagafuchi, A., Takeichi, M. (1988) *Guidance of optic nerve fibres by N-cadherin adhesion molecules.* Nature 334, 62 – 64 Miclea, M. (1999) *Psihologie cognitivă. Modele teoretico-experimentale.* Polirom.

Iaşi Minkowski, A. (1967) *Regional development of the brain in early life.* Blackwell.

Oxford Miu, A. (2001) *Factori neuromodulatori ai plasticităţii comportamentale.*

Manualul Simpozionului „Zilele Psihologiei Timişorene", 15 Nishizuka, Y. (1984) *Turnover of inositol phospholipids and signal transduction.*

Science 255, 1365 – 1370 O'Dell, T.J., Kandel, E.R., Grant, S.G. N. (1991) *long-termpotentiation in the hippocampus is blockedby tyrosine kinase inhibitors.* Nature (Londra) 353.

558 – 560 O'Dell, T.J., Hawkins, R.D., Kandel, E.R., Arancio, O (1991) *Tests of the roles oftwo diffusible substances în long term*

potentiation: Evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. Porc. Natl. Acad. Sci.

USA 88, 11285 – 11289 O'Keefe, J., Nadei, L. (1978) *The hippocampus as a cognitive map.* Clarendon

Press, Oxford O'Kusky, J.R. (1985) *Synapse elimination in the developing visual cortex: A*

morphometric analysis în normal and dark-reared cats. Brain Res. 354.

81 – 91 O'Kusky, J.R., Norman, M.G. (1995) *Sudden infant death syndrome: Increased synaptic density in the central reticular nucleus of the medulla.* J.

Neuropathol. Exp. Neurol. 53, 263 – 271 Olteanu, A., Lupu, V. (2000) *Neurofiziologia sistemelor senzitivo-senzoriale.* Presa

Universitară Clujeană, Cluj-Napoca Olteanu, A., Lupu, V., Miu, A. (2001) *Neurofiziologia comportamentului uman.*

Presa Universitară Clujeană, Cluj-Napoca Olteanu, A., Miu, A., Cipleu, M., Lupu, V. (2000). *Influenţe modulatoare asupra învăţării şi memoriei.* Cogniţie, Creier, Comportament, 5, 347 – 365 Opere, A., Miu, A. (2001) *Sisteme mnezice multiple şi conştiinţă: Un model neurocognitiv.* Cogniţie, Creier, Comportament, 5, 193 – 219 „Palade, G.E., Palay, S. L. (1954) *Electron microscope observations of interneuronal andneuromuscular synapses.* Anat. Rec. 118, 335 – 336

Aceasta este printre primele descrieri electronmicroscopice ale sinapselor neuromusculare. Palay, S.L. (1956) *Synapses in the central nervous sistem.* J. Biophys. Biochem.

Cytol. 2, 193 – 206 Palay, S.L. (1958) *The morphology of the synapses of the central nervous sistem.*

Exp. Cell. Res. 5, 275 – 293 Patel, N.B., Poo, M.M. (1982) *Orientation of neuritic growth by extracellular fields.* J. Neurosci. 2, 483 – 496 Patel, N.B., Poo, M.M. (1984) *Perturbation of the direction of murite growth by pulsed and focal electric fields.* J. Neurosci. 4, 2939 – 2947

Patel, N.B., Xie, Z.-P., Young, S.H., Poo, M.M. (1985) *Response ofnerve growth cone to focal electric currents.* J. Neurosci. Res. 13, 245 – 256 Peinado, A., Yuste, R „Katz, L.C. (1993) Ex*tensive dye coupling between rat neocortical neurons during the period of circuit formation. Ne*uron 10.

103 – 114 Penn, A.A., Riquelme, P.A., Feller, M.B., Shatz, C. J. (1998) *Competititon în retinogeniculate patterning driven by spontaneous activity.* Science 279.

2108 – 2112 Penn, A.A., Wong, R.O., Shatz, C.J. (1994) *Neuronal coupling in the developing mammalian retina.* J. Neuosci. 14, 3805 – 3815 Perez-Velasquez, J.L., Valliante, T.A., Carlen, P.L. (1994) *Modulation of gap funcţional mechanisms during calcium-free induced field burst activity: a possible role for electrotonic coupling în epileptogenesis.* J. Neurosci. 14.

4308 – 4317 Petit, T.L. (1995) Structure and plasticity of the Hebbian synapse: the cascading events for memory storage. În: Spear, N.E., Spear, L.P., Woodruff, M. L.

(Eds.): *Neurobehavioral plasticity: Learning, development, and response to brain insults* (pp. 185 – 204). Lawrence Erlbaum, Hillsadale Pfenninger, K.H., Maylie-Pfenninger, M.-F. (1981) *Lectin labelling of sprouting neurons. II. Relative movement and appearance of glycoconjugates during plasmalemmal expansion.* J. Cell. Biol. 89, 547 – 559 Pfenninger, K.H., Maylie-Pfenninger, M.-F., Friedman, L.B., Sinkowâtz, P.

(1984) ///. *Lectin labelling of sprouting neurons: type specific glycoconjugates on growth cones of different origin.* Dev. Biol. 106, 109

120 Preuss, T. Goldman-Rakic, P.S. (1991) *Myeloand cytoarchitecture of the granular frontal cortex and surrounding regions in the strepsirhine primate Galago and the anthropoid primate Macaca.* J. Comp. Neurol.

310, 429 – 474 Prokop, A. (1999) *Integrating bits and pieces: Synapse structure and formation in*

Drosophila embryos. Co. Tissue Res. 297, 169 – 186 Prokop, A., Landgraf, M., Rushton, E., Broadie, K., Bate, M. (1996) *Presynaptic development at the Drosphila neuromuscular junction: Assembly and localization of presynaptic active zones.* Neuron 17, 617 – 626 Quartz, S.R. (1999) *The constructiv ist brain.* Trends. Cognitive Sci. 3, 48 – 57 Rajan, I., Cline, H.T. (1998) *Glutamate receptor activity is required for normal development of tectal cell dendrites in vivo.* J. Neurosci. 18, 7836 – 7846 Rajan, L, Witte, S., Cline, H.T. (1999) *NMDA receptor activity stabilizes presynaptic retinotectal axons and postsynaptic optic tectal cell dendrites in vivo.* J. Neurobiol. 38, 357 – 368 Rakic, P., Bourgeois, J.P., Eckenhoff, M.F., Zecevic, N., Goldman-Rakic, P. S.

(1986) *Concurrent overproduction of synapses în diverse regions of the primate cerebral cortex.* Science 232, 232 – 235

260

Studiul arată că sinaptogeneză decurge relativ sincronizat în toate ariile corticale, nu de la cele senzitivo-senzoriale spre cele motorii şi de asociaţie, aşa' cum se susţinea. Ramón y Cajal, S. (1888) *Estructura de los centros nerviosos de las aves.* Rev.

trim. Hist. Norm. Patol. 1, 1-10 Ramón y Cajal, S. (1890) *A quelle époque apparaissent les expensions des celules nerveuses de la moelle epinere dupoulet?* Anat. Anz. 5, 609 – 613 Ramón y Cajal, S. (1906) *The structure andeonnexions ofneurons.* Physiol. Med.

(Prelegere Nobel), 220 – 253 Ramón y Cajal, S. (1911) *Histologie du sisteme nerveux de l'homme et des vertebres.* Maloine, Paris Ramón y Cajal, S. (1934) *Lespreuves objectives de l'unite anatomique des celules nerveuses.* Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid, 29, 1 „Ranscht, B. (2000) *Cadherins: molecular codes for axon guidance and synapse formation.* Int. J. Devi. Neuroscience 18, 643 – 651

Expunerea caracteristicilor biochimice ale căderinelor care permit ca aceste molecule să participe la stabilizarea sinapselor dintre două celule care suportă adeziune homotipică pentru că atât membrana presinaptică, cât şi cea postsinaptică prezintă aceleaşi molecule de adeziune. Ranscht, B., Bronner-Fraser, M. (1991) *T-Cadherin expression alternates with migrating neural crest cells in the trunk of the avion embryo.* Development

111, 15 – 22 Raper, J.A., Bastiani, M.J., Goodman, C.S. (1983) *Pathfmding by neuronal growth cones în grasshopper embryos. II. Selective fasciculation onto specific axonalpathways.* J. Neurosci. 3, 33 – 41 Redi.es, C. (2000) *Cadherins in the central nervous sy stern.* Prog. Neurobiol. 61.

611 – 648 Reh, T.A., Constantine-Patton, M. (1984) *Retina! ganglion cell terminals change their projection sites during larval development of Rana pipiens.* J.

Neurosci. 4, 442 – 457 Rheuben, M.B., Yoshihara, M., Kidokoro, Y. (1999) *Ultrastructural correlates of neuromuscular junction development.* Int. Rev. Neurobiol. 43, 69 – 92 „Roerig, B., Feller, M. B. (2000) *Neurotransmitters and gap junctions in developing neural circuits.* Brain Res. Rev. 32, 86 – 114

Sunt prezentate datele care susţin rolul joncţiunilor de tranzit

(gap) în generarea valurilor de activitate afectrică spontană care contribuie la sinaptogeneză în retina şi izocortexul în dezvoltare, Schaefer, A.M., Nonet, M. (2001) *Celular and molecular insights into presynaptic assembly.* Curr. Opin. Neurobiol. 11, 127 – 134 Schatz, C. J. (1996) *Emergence oforder în visula sistem development,* Porc. Nati.

Acad. Sci. USA 93, 602 – 608 Schlosshauser, B., Schwarz, U., Rutishauser, U. (1984) *Topological distribuitoon of different forms of neural cell adhesion molecule in the developing chick visual sistem.* Nature 140, 141 – 143

261

Schreyer, D.J., Jones, E.G. (1982) *Growth and target finding by axons of the corticospinal tract în prenatal and postnatal rats.* Neuroscience 1, 1837

1853 Schreyer, D.J., Jones, E.G. (1983) *Growing corticospinal axons bypass lesions of neonatal rat spinal cord.* Neuroscience 9, 31 – 40 Seeley, P.J., Greene, L.A. (1983) *Short-latency local actions of nerve growth factor at the growth cone.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2789 – 2793 Shaw, G., Bray, D. (1977) *Movement and extension of isolatedgrowth cones.* Exp.

Cell. Res. 104, 55 – 62 Sherrington, C.S. (1906) *The integrative action of the nervous sistem.* Yale

University Press, New Haven Singer, M, Nordlander, R.H., Egar, M. (1979) *Atonal guidance during embryogenesis and regeneration in the spinal cord of the newt: The blueprint hypothesis of neuronal pathway patterning.* J. Comp. Neurol.

185, 1 – 22 Son, H., Lu, Y.-F., Zhuo, M., Arancio, O., Kandel, E.R., Hawkins, R.D. (1998)

The specific role ofc GMP în hippocampal LTP. Learn. Mem. 5, 231 – 245 Sorra, K.E., Fiala, J. C, Harris, K.M. (1998) *Criticai assessment of the involvement ofperfarations, spinules, and spine branching în hippocampal synapse formation.* J. Comp. Neurol. 398, 225 – 240 Sperry, R.W. (1943) *Efect of 180 degrees rotation of the retina! field on visuomotor cooordination.* J. Exp. Zool. 92, 263 – 279 Sperry, R. W. (1948) *Patterning of central synapses în regeneration of the optic nerve în teleosts.* Physiol. Zool. 21, 351 – 361 Sperry, R.W. (1963 a) *Chemoaffânity in the orderly growth of nerve fiber patterns andeonnections.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 50, 703 – 710 „Sperry, R. W. (1963 b) *Evidence behind chemoaffânity theory of synpatic patterning.*

Anat. Rec. 145, 288

Un text excelent în care sunt trecute în revistă probele care susţin teoria chemoafinităţii neuronale. Articol de referinţă al lui Sperry. Sperry, R. W… (1965) Embryogenesis of behavioral nerve nets. În: DeHaan, R. L.

Ursprung, H. (Eds.): *Organogenesis* (pp. 161 – 186). Holt, Rinehart &

Winston, New York Stallcup, W.B., Beasley, L., Levine, J. M. (1985) *Antibody against nerve growth factor inducible large externai (NILE) glycoprotein's labels nerve fibre tracts in the developing rat nervous sistem.* J. Neurosci 5, 1090 – 1101 Stewart, B.A., Schuster, C. M, Goodman, C.S., Atwood, H.L. (1996)

Homeostasis of synaptic transmission în Drosophila with genetically alterednerve terminal morphology. J. Neurosci. 16, 3877 – 3886 Sussdorf, N.S., Campenot, R.B. (1986) *Influence of the extracellular potassium environment on neurite growth în senzory neurons, spinal cord neurons ans sympathetic neurons.* Dev. Brain Res. 25, 43 – 52 Syed, N.I., Richardson, P., Bulloch, A.G.M. (1996) *Ciliary neurotrophic factor, unlike nerve growth factor, supports neurite outgrowth but not synapse formation in adultlymnaea neurons.* J. Neurobiol. 29, 293 – 303

262

Tanaka, H., Shan, W., Phillips, G.R., Arndt, K., Bozdagi, O., Shapiro, L., Huntley.

G. W., Benson, D.L., Colman, D.R. (2000) *Molecular modification of Neadherin în response to synaptic activity.* Neuron 25, 93 – 107 Thomas, J.B., Wyman, R.J. (1983) *Normal and mutant connectivity between identified neurons în Drosophila.* Trends. Neurosci. 6, 214 – 219 Trisler, G.D., Schneider, M.D., Nirenberg, M. (1981) *A topographic gradient of molecules în retina con be used to identify neuron position.* Porc. Natl.

Acad. Sci. USA 78, 2145 – 2149 Tully, T. (1997) *Regulation of gene expression and its role în long-term memory and synaptic plasticity.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4239 – 4241 Turner, A.M., Greenough, W.T. (1985) *Diffrenţial rearing efects on rat visual cortex synapses. I. Synaptic and neuronal density and synapses per neuron.* Brain Res. 329, 195 – 203 Valtorta, F., Iezzi, N., Benfenati, F., Lu, B., Poo, M.M., Greengard, P. (1995)

Accelerated structural maturation induced by synapsin I at developing neuromuscular synapses of Xenopus laevis. Eur. J. Neurosci.7, 2 61 – 270 Valverde, F. (1967) *Apical dendritic spines of the visual cortex and light deprivation in the mouse.* Exp. Brain Res. 3, 337 – 352 Valverde, F. (1963) *Structural changes in the area striata of the mouse after enucleation.* Exp. Brain Res. 5, 274 – 292 Valverde, F. (1971) *Rate and extent of recovery from dark rearing in the visual cortex of the mouse.* Brain Res. 33, 1-11 Weeks, A.C.W., Ivanco, T.L., Leboutillier, J. C, Racine, R.J., Petit, T.L. (1999)

Sequencial changes in the synaptic structural profile following long-term potentiation in the rat dentate gyrus: I. The intermediate maintenance phase. Synapse 31, 97 – 107 Weeks, A.C.W., Ivanco, T.L., Leboutillier, J. C, Racine, R.J., Petit, T.L. (2000)

Sequencial changes in the synaptic structural profile following long-term potentiation in the rat dentate gyrus: II. Induction/early maintenance phase. Synapse 36, 97 – 107 Weeks, A.C. W, Ivanco, T. L, Leboutillier, J. C, Racine, R. J, Petit, T.L. (2001)

Sequencial changes in the synaptic structural profile following long-term potentiation in the rat dentate gyrus: III. Long-term maintenance phase.

Synapse 40, 74 – 84 Weidmann, S. (1952) *The electricul constants of Purkinje fibers.* J. Physiol.

(Londra) 118, 348 – 360 Weiss, P.A. (1931) *Das Rezonanzprinzip der Nerventătigkeit.* Wien. Klin.

Wochenschr. 39, 1-17 Weiss, P.A. (1936) *Selectivity controlling the central-peripheral relations in the nervous sistem.* Biol. Rev. 11, 494 – 531 Weiss, P.A. (1939) The development of the nervous sistem (Neurogenesis), Part

IV. în: *Principles of Development.* Holt, Rinehart & Winston, New York Wessells, N.K., Johnston, S.R., Nuttall, R.P. (1978) *Axon, initiation andgrowth cone regeneration in culturedmotor neurons.* Exp. Cell. Res. 117, 335 – 345

West, A.E., Chen, W.G., Dalva, M.B., Dolmetsch, R.E., Komhauser, J. M.

Shaywitz, A.J., Takasu, M.A., Tao, X., Greenberg, M.E. (2001) *Calcium regulation of neuronal gene expression.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 98.

11024 – 11031 Williams, R.W., Borodkin, M., Rakic, P. (1991) *Growth cone distributionpattems in the optic nerve offetal monkeys: implications for mechanisms of axon* gwztfawce. J. Neurosci. 11, 1081 – 1094 Wong, R.O.L. (1999) *Role of retina! waves în visual sistem development.* Annu.

Rev. Neurosci. 22 Wong, R.O., Chernavsky, S.J., Smith, S.J., Shatz, C.J. (1995) *Early funcţional neural networks in the developing retina.* Nature 374, 716 – 718 Wohrn% J. C, Puelles, L., Nagakawa, S., Takeichi, M., Redies, C. (1998) *Cadherin expression in the retina and retinofugal pathways of the chicken embryo.* J.

Comp. Neurol. 396, 20 – 38 „Wu, G.Y., Zou, D.J., Rajan, I., Cline, H. (1999) *Dendritic dynamics in vivo changes during neuronal maturation.* J. Neurosci. 19, 4472 – 4483

Observarea directă a neuronilor din tectumul optic de la *Xenopus* a permis împărţirea dezvoltării arborelui dendritic al neuronilor în patru faze. Este discutată contribuţia activităţii sinaptice susţinute de receptorii NMDA ŞI AMPA la dinamica arborelui dendritic şi sinaptogeneză. Yamagata, M., Herman, J.P., Sanes, J.R. (1995) *Lamina-specific expression of adhesion molecules în developing chick optic tectum.* J. Neurosci. 15.

4556 – 4571 Yap, A.S., Brieher, W.M., Gumbiner, B.M. (1997) *Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions.* Annu. Rev. Celi Dev. Biol.

13, 119 – 146 Yoon, IVI. (1971) *Reorganization of the retinotectal projection following surgical operations on the optic tectum în goldfish.* Exp. Neurol. 33, 395 – 411 Yuste, R., Peinado, A., Katz, L.C. (1992) *A sistem of neuronal domains în developing neocortex.* Science 257, 665 – 668 Zecevic, N., Bourgeois, J.P., Rakic, P. (1989) *Changes în synpatic density în motor cortex ofrhesus monkey duringfetal and postnatal life.* Dev. Brain

Res. 50, 11 – 32 Zecevic, N., Milosević, A. (1997) *Inițial development of gamma-amynobutyric acid immunoreactivity in the human cerebral cortex.* J. Comp. Neuroî. 380.

495 – 506 Zecevic, N., Rakic, P. (1991) *Synaptogenesis în monkey somatosensory cortex.*

Cereb. Cortex 1, 510 – 523 Ziv, N.E., Smith, S.J. (1996) *Evidence for a role of dendritic filopodia în synaptogenesis and spine formation.* Neuron 17, 91 – 102 Zhuo, M, Small, S.A., Kandel, E.R., Hawkins, R. D.

(1993) *Nitirc oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in the hippocampus.* Science 260, 1946 – 1950

264

Zhuo, ML, Latinen, J.T., Li, X.

— C, Hawkins, R.D. (1998) *On the respective roles of nitric oxide and carbon monoxide în long-term potentiation in the hippocampus.* Learn. Mem. 5, 467 – 480

265

Capitolul 5

MIELINIZAREA ŞI MATURAREA CIRCUITELOR NERVOASE

CONŢINUTUL CAPITOLULUI:

Mielinizarea diferenţiată a creierului şi a sistemului nervos periferic

Organizarea şi structura mielinei

Originea, diferenţierea şi migrarea celulelor secretoare de mielina

Factori care influenţează direct mielinizarea

Implicaţiile mielinizării pentru funcţionarea sistemului, nervos

Rezumat

Dezvoltarea sistemului nervos este continuată, după sinaptogeneză şi stabilirea circuitelor nervoase, de un alt eveniment, mielinizarea. Mielinizarea ţine mai degrabă de maturarea circuitelor nervoase pentru că presupune învelirea fibrelor nervoase din sistemele nervos central şi periferic într-o teacă lipoproteică care are acelaşi rol. ca şi materialele cu care se izolează cablurile electrice: conservarea semnalului. Fibra nervoasă poate fi asimilată unui asemenea cablu pentru că principala ei funcţie este de a conduce semnalul nervos, care presupune în primul rând modificări de natură electrică la nivelul neuronului. Astfel, mielina este învelişul pe care sistemul nervos l-a dezvoltat pentru a izola electric circuitele nervoase şi a mări viteza de conducere a semnalului nervos.

Modificările morfologice determinate de mielinizare la nivelul sistemului nervos central, de pildă, reprezintă unul din evenimentele vizibile, chiar şi macroscopic, ale dezvoltării nervoase. Ceea ce vrem să spunem este că, dacă luăm un creier în mână, fără să avem la dispoziţie metode histologice, biochimice sau electrofiziologice, de exemplu, nu putem decât să îl contemplăm ca pe un organ format dintr-un ţesut

moale, care, chiar şi la simpla disecţie, nu îşi arată uşor organizarea structurală şi funcţională. Unul din puţinele aspecte pe care le putem însă observa este diviziunea creierului în regiuni de substanţă cenuşie şi de substanţă albă. La om, substanţa albă reprezintă mai mult de 40% din suprafaţa unei secţiuni frontale, de pildă, la nivelul unei emisfere telencefalice. Şi nervii care se răspândesc în tot corpul sunt înveliţi în acelaşi material albicios şi de consistenţă grăsoasă. Dacă adăugăm un microscop optic investigaţiei noastre, vedem că substanţa albă este formată din cilindri izolaţi cu acelaşi material, aceştia fiind axonii înveliţi în mielina.

Aproape fără să vrem, am spus povestea primei descrieri a mielinei, făcută de R. Virchow în 1864 (gr. *myelos,* măduvă). Termenul introdus de Virchow reflectă observaţia sa că mielina este abundentă spre interiorul creierului (pentru detalii, vezi: Morell & Norton, 1980). Procesul prin care se formează învelişul de mielina, odată cu care circuitele nervoase devin mature funcţional, se numeşte mielinizare. Să notăm însă că nu toate fibrele nervoase sunt mielinizate (pentru

detalii, vezi: Olteanu & Lupu, 2000, pp. 53 – 56). Noi ne vom ocupa în acest capitol numai de cele mielinizate

Totodată, mielinizarea ne permite să ilustrăm o altă interacţiune între cele două tipuri de celule ale sistemului nervos, neuronii şi celulele gliale. Aceasta pentru că mielina este secretată de celule gliale specializate. În SNP, mielina este secretată de celule gliale numite Schwann, numite după cel care le-a descris prima dată în jurul anului 1840. La început, s-a crezut că mielina este secretată de axoni, dar, odată cu aplicarea electronmicroscopiei, B.B. Geren a indicat că mielina este secretată, de fapt, de celule adiacente axonului. Aceste celule au un aspect aplatizat, cu un nucleu alungit, orientate longitudinal faţă de axon. Celulele Schwann secretă mielina pentru a înveli o porţiune unică a unui axon din SNP. în SNC, celulele secretoare de mielina se numesc oligodendrocite, celule macrogliale cu numeroase prelungiri care mielinizează – 40 de neuroni. Vedem deja, deci, că organizarea mielinizării este diferită în SNP faţă de SNC (pentru o sinteză, vezi: Peters, Palay & Webster, 1990).

Mielina este o invenţie foarte lucrativă a sistemului nervos. Înainte de toate, trebuie să notăm o condiţie fundamentală a mielinizării. R.L. Friede este cel care a indicat pentru prima dată

dependenţa mielinizării de diametrul axonului. Un lucru foarte interesant este că, deşi toate celulele Schwann pot secreta mielina, ele nu vor declanşa acest proces decât în cazul axonilor cu diametru mai mare de O.7 u. m (Webster, 1971). De ce este mielinizarea un proiect bun? Este intuitiv să ne gândim că răspândirea extinsă a mielinei în sistemul nervos trebuie să aibă ia bază eficienţa sa funcţională. Şi aşa este. În primul rând, acesta este economic din punct de vedere spaţial. La fibrele amielinice, s-a estimat că viteza creşte cu rădăcina pătrată a diametrului fibrei. Deci, pentru ca viteza de conducere a impulsului nervos să se dubleze, ar fi necesar ca fibra nervoasă să devină de patru ori mai groasă. La fibrele mielinice însă, viteza creşte linear cu diametrul fibrei, deci, dublarea vitezei de conducere implică doar dublarea diametrului fibrei nervoase, într-o formulă contrasă, creşte semnificativ viteza de conducere a impulsului nervos, în condiţiile în care nu se consumă spaţiu. În fond, ţesutul nervos este costisitor, indiferent care ar fi scopul evoluţiei! (B. L. Finlay, comunicare personală) La un mamifer cu o temperatură de.37° C, o fibră amielinică ar trebui să aibă un diametru de câţiva milimetri pentru a conduce un impuls cu viteza de IOC m/s, comparată cu o fibră mielinică ce ar trebui să aibă numai 20 um, adică a cincizecea parte dintr-un milimetru.

La baza eficienţei mielinei stă şi un calcul energetic. La broaşte, de pildă, există fibre mielinizate cu diametru de – 12 um care conduc semnalul nervos cu o viteză de 25 m/s. Celebrul axon gigantic al sepiei pe care A.F. Huxley şi A.L. Hodgkin au demonstrat baza ionică a conducerii impulsului nervos, are un diametru de 500 um, conduce impulsul nervos cu aceeaşi viteză de 25 m/s, dar consumă de 5.000 de ori mai multă energie. Am putea spune că avem cel puţin două motive pentru care sistemul nervos a preferat mielina ca mecanism pentru creşterea vitezei de conducere nervoasă: spaţiul şi energia.

În acest capitol, vom aborda originea acestor celule secretoare de mieâină, diferenţierea şi migrarea lor spre ţinta pe care trebuie să o mielinizeze, precum şi factorii moleculari care modulează aceste procese. În **final,** premiul pe care îl oferim este o discuţie despre funcţia de semnalizare a sistemului nervos. Cu alte cuvinte, care sunt regulile după care putem asimila comportamentul activităţii electrice a creierului?

5.1 Mielinizarea diferenţiată a creierului şi sistemului nervos periferic

Mielinizarea a fost descrisă mai ales prin aplicarea post mortem a unor metode histologice obişnuite pentru punerea în evidenţă a mielinei (de ex., coloraţia Weigert), în creierul unor fetuşi în diferite perioade de dezvoltare. De aici, nu a putut fi decât inferată evoluţia diferenţiată topologic a mielinizării (vezi: Yakovlev & Lecours, 1967)

Urmărirea *in vivo* la om a evoluţiei mielinizării a fost posibilă mai ales odată cu dezvoltarea metodelor neuroimagistice, în particular, imagistica de rezonanţă magnetică (RMNF) şi, mai recent, imagistica tridimensională cu transfer de magnetizare (MTI, *magnetization transfer imaging).* Fără a intra în detalii tehnice asupra acestei metode, să notăm numai că modificări le care intervin în timpul dezvoltării creierului modifică unii parametri sensibili la scăderea concentraţiei tisulare de apă şi creşterea concentraţiilor colesterolului şi glicolipidelor (pentru detalii, vezi: McArdle & colab., 1987; Barkovich & colab., 1988). De pildă, MTI este sensibilă la prezenţa mielinei pentru că se bazează pe modificarea magnetizării ţesuturilor biologice datorită schimbării caracteristicilor magnetice ale protonilor din apă şi protonilor care sunt legaţi de macromolecule, dinamica biofizică a acestora determinând un parametru dat de raportul lor, numit raport volumetric de transfer de magnetizare (pentru detalii, vezi: Wolff & Balaban, 1989). Cu ajutorul acestor metode s-a putut observa că, la om. mielinizarea se face într-o secvenţă ordonată, determinată mai ales de modificările topografice din sistemul nervos şi că acest proces se prelungeşte mult mai mult decât se credea, până în adolescenţa târzie (-30 de ani) (Gilles, Shankle & Dooling, 1983; Barkovich, Lyon & Evrard, 1992).

Cercetări recente au arătat că, la naştere, creierul este, în cea mai mare parte, nemielinizat şi că, în primii doi ani postnatal, mielinizarea progresează foarte rapid (van Buchem & colab., 2001). Cu toate acestea, se ştie că mielinizarea începe înainte de 30 de luni (gestaţionale), în timpul vieţii prenatale. În această perioadă de mielinizare timpurie sunt mielinizate o serie de nuclei şi circuite nervoase (vezi: **Tabelul V.I** şi Counsell & colab., 2002). Aşa cum am spus, mielinizarea se realizează structurat, după un proiect topografic, astfel că primele sunt mielinizate fibrele din SNP, fiind mielinizate mai întâi rădăcinile motorii şi, apoi, cele senzitive (< 20 de săptămâni

gestaţionale). În sistemul nervos central, mielinizarea începe în măduva spinării şi avansează rostral, fibrele nervoase senzitive fiind mielinizate înaintea celor motorii (vezi: Yakovlev & Lecours, 1967).

269

Tabel V.l

Evoluţia prenatală a mielinizării în creierul fătului uman (după Counsell & colab., 2002)

Perioadă de dezvoltare (săptămâni — Gestaţionale)	**Structură nervoasă mielinizată**	**Tract nervos mielinizat**
< 30 săptămâni		
30 – 36 săptămâni		
37 – 42 săptămâni		

— Nucleul vestibular, nuclei olivari inferiori, decusaţia pedunculilor cerebelari superiori;

— Vermis cerebelar, pedunculi cerebelari inferiori, nucleu dinţat cerebelar;

— Corpi geniculaţi mediali, nuclei ventrolaterali ai talamusului, coliculi inferiori;

— Nuclei subtalamici;

— Nuclei mediali laterali;

— Trunchiul cerebral dorsal;

— Globus pallidus dorsal putamen.

fascicul longitudinal medial, lemniscul medial şi lateral;

fasciculele gracilis şi cuneatus;

— (iniţiere) partea posterioară a capsulei interne;

— (iniţiere) corona radiata, unele tracturi corticospinale;

(continuare) partea posterioară a capsulei interne;

— (continuare) corona radiata, unele tracturi corticospinale.

Un sistem experimental cu ajutorul căruia a fost studiată evoluţia mielinizării este reprezentat de nervul optic (vezi: Raff, 1989). Studii recente efectuate pe nervul optic de şobolan, prelevat postnatal au pornit de la premisa că mielinizarea este un proces care consumă energie, astfel că fazele acestui proces ar putea fi caracterizate prin toleranţa la deprivare energetică (Fern & colab., 1998). Se ştie, de

altfel, că afecţiuni neurologice cum ar fi leucomalacia periventriculară se asociază cu anoxia sau ischemia neonatală (vezi: Volpe, 2000).

Toleranţa substanţei albe la deprivare energetică descrie patru etape care pot fi corelate cu patru faze ale mielinizării. Primul stadiu ar putea fi numit premielinizare (zilele postnaatale P O-ţi 4), fiind caracterizat de toleranţă crescută la condiţii de anoxie, hipoglicemie şi ambele. Cea de-a doua fază, mielinizarea timpurie (P 5-ţi 20), este definită de toleranţa parţială a fibrelor nervoase la anoxie sau hipoglicemie, dar nu şi a celor două combinate. În stadiul de mielinizare târzie (zilele postnatale P 21-ţi 49), fibrele nervoase au o toleranţă redusă la anoxie, hipoglicemie şi la cele două condiţii combinate, iar în faza de maturare oP 50), se remarcă o toleranţă redusă la anoxie, hipoglicemie şi a celor două combinate. Concluzia acestor cercetări este că rezistenţa relativă a funcţiei nervului optic la

270

scăderea glucozei în prezenţa, însă, a oxigenului, comparată cu scăderea glucozei în absenţa oxigenului, se datorează, probabil, dependenţei temporare în fazele târzii ale mielinizării fibrelor nervului optic de unele rezerve energetice (de ex., glicogen astrocitic, aminoacizi, fosfolipide) a căror utilizare este oxigen-dependentă (Fern & colab., 1998).

În SNP, la începutul mielinizării, axonii sunt înconjuraţi de celule Schwann care, odată ce aderă la un axon, încep să prolifereze. Pe măsură ce proliferează, celulele Schwann migrează de-a lungul axonilor pentru ca să se stabilească în final o relaţie de o celulă Schwann/porţiune de axon. După stabilirea acestui raport de corespondenţă, celulele Schwann încep să îşi extindă procese laterale şi secretă o membrană bazală *(lamina basalis)* la suprafaţa abaxonală (gr. *ab,* de la), adică în partea distală a celulei Schwann faţă de cea care aderă la axon (adaxonală; gr. *ad,* la) (Bunge, Bunge & Bates, 1989). Odată cu apariţia acestei membrane bazale, celulele Schwann îşi finalizează diferenţierea ca celule secretoare de mielină şi încep mielinizarea axonului (Eldridge, Bunge & Bunge, 1989).

Cehia Schwann A Celulă Schwannb

comprimarea mielinei nucleul celulei Sclav arm incizuri Schmidtrlanterman. membrana bazată

Citoplasmă llllllP!! «>.

r în ilij!

JJJJO, *umm* nod Ranvier mielină compactă regiuni paranodale

Fig. 5.1 *Diagramă a unei secţiuni longitudinale printr-un axon mielinizat din SNP. în partea stângă se observă un detaliu al mielinei compacte, cu liniile dense majore (LDM) şi liniile intraperiodice (Lip).* (Modificat după Garbay & colab., 2000).

Structura tridimensională a învelişului de mielină a fost descrisă pentru prima dată de R.P. Bunge care a reconstituit-o din secţiuni seriale bidimensionale analizate la microscopul electronic (pentru o sinteză, vezi: Bunge, Bunge & Eldridge, 1986). Capacitatea fibrelor nervoase (mielinizate) de a reorienta lumina polarizată era cunoscută încă din secolul XIX, dar, de-abia în 1913, G. Gothlin demonstrează că această capacitate se datorează organizării regulate a lipidelor din constituţia mielinei, astfel că, dacă aceste molecule sunt extrase cu alcool, proprietăţile optice ale mielmei se modifică. Odată cu perfecţionarea metodei difracţiei razelor X, s-a putut stabili distanţa dintre moleculele structurale ale mielinei. Mielină are o structură moleculară stratificată, compusă din straturi

271

bilipidice groase de – 5.5 µm ce alternează cu straturi proteice, cu difracţie mai mare, groase de – 3 µm (Morell & Norton, 1980).

mi eli **ulei**

— Mezai an lateiai

V *p*

SIJ – aiiu St

I i i-ir

Fig. 5.2 *Strat de mielină neînfăşurat pe axon la care se pot observa canalele citoplasmice şi relaţia cu axonul, de la mezaxonul intern până la mezaxonul extern.* (Modificat după Morell & Norton, 1980)

Această structură corespunde perfect cu descrierea microscopică a straturilor de mielină. Pe măsură ce celula Schwann secretă mielină, ea se roteşte în jurul axonului şi îl înfăşoară de mai multe ori. Materialul citoplasmic este exclus din structura stratului de mielină prin comprimarea unor straturi de membrană celulară Schwann ce formează ceea ce se cheamă linii dense, suprafeţele extracelulare ale membranelor unor spirale consecutive de mielină formând liniile intraperiodice (Fig. 5.1). Acest sandviş lipoproteic ce formează teaca de mielină este străbătut de la corpul celular, pe tot

parcursul straturilor concentrice pe care le-a format-o celulă Schwann în jurul unui axon, de canale citoplasmice care străbat, deci, teaca după un traseu helicoidal şi se numesc incizuri Schmidt-Lanterman (Fig. 5.2). Acestea au, s-a presupus, rol trofic, precum şi de transport a unor molecule ce participă la turnoverul celulei (Morell & Norton, 1980). Studii mai recente au confirmat această ipoteză, indicând existenţa unor joncţiuni de tipii joncţiunilor de tranzit *(gap junctions)* la nivelul incizurilor Schmidt-Lanterman. Aceste joncţiuni de tranzit leagă două membrane succesive ale aceleiaşi celule Schwann, dar aproape niciodată două celule Schwann adiacente (vezi: Paul, 1995). Injectarea unor markeri cu masă moleculară mică (<400 Da) la nivelul regiunii perinucleare a celulelor Schwann a arătat că aceştia difuzează prin incizurile Schmidt-Lanterman din porţiunea externă şi abaxonală a tecii de mielină până în porţiunea internă şi adaxonală a acesteia. Markerul nu a difuzat spre celule Schwann adiacente, iar markeri cu greutate moleculară mare (-3.000 Da) au rămas blocaţi în regiunea externă, în prima linie intraperiodică (Balice-Gordon; Bône & Scherer, 1998). Deci incizurile au rolul de facilitare a difuziunii pasive unor molecule cu masă moleculară mică, cum ar fi ionii, mesagerii de ordinul II şi unii metaboliti.

272

Axonii neuronilor din SNP sunt mielinizaţi segmentat de mai multe celule Schwann (Fig. 5.3). Între aceste segmente mielinizate, există porţiuni nemielinizate numite noduri Ranvier, în cinstea anatomopatologului L.A. Ranvier care a fost unul din primii cercetători ce au sugerat în 1878 rolul izolator al mielinei. Ranvier folosea analogia dintre axonii mielinizaţi şi cablurile de telegraf transatlantice pentru asamblarea cărora exista un mare entuziasm în acea vreme. Limitele externe şi interne ale unui strat comprimat de mielină se numesc mezaxoni intern, respectiv, extern. Regiunea compactă de mielină dintre două noduri Ranvier se numeşte regiune internodală. Membrana axonului (axolemă) ia, deci, contact cu mediul extracelular numai în dreptul nodurilor Ranvier, singurele porţiuni care permit schimburile ionice şi depolarizarea. Când membrana este depolarizată în dreptul unui nod, semnalul electric nu se poate propaga continuu pentru că, aş. acum ştim, mielină este un material cu rezistenţă electrică mare. Prin urmare, semnalul sare de la un nod la altul, acest mod de conducere fiind numit saltatoriu. Acest mecanism pare să fie

chiar şi o invenţie economică energetic întrucât este necesară mobilizarea a mai puţini ioni pentru depolarizare şi, implicit, mai puţină energie pentru tranzitul activ al acestor ioni.

cel achwann
ule

M

§1
1

ax e elule S
onul chwaim
nucle
ul celulei
S
chwann
sora internodală nod Ranvier

Fig. 5.3 *Dezvoltarea tecii de mielină în SNP. Se observă înfăşurarea celulelor Schwann în jurul axonilor, formarea şi comprimarea straturilor concentrice de mielină. Între segmentele de axon mielinizate de câte o celulă Schwann, numite zone internodale, sunt indicate porţiunile nemielinizate denumite noduri ale lui Ranvier. (*Modificat după Olteanu & Lupu, 2000)

5.2 Organizarea şi structura mielinei

Structura compactă a tecii de mielină face foarte dificilă izolarea şi purificarea diferiţilor constituenţi ai acesteia (pentru detalii, vezi: Norton & Poduslo, 1973). Cu toate acestea, caracterizarea biochimică a mielinei pare să fie o temă foarte prolifică a neuroştiinţelor contemporane. Atunci când a fost descrisă

273

structura lipoproteică a tecii de mielină, acest lucru a atras atenţia pentru că structura era similară structurii membranelor celulare de la mamifere, în general. Ori, la vremea aceea, se considera că mielina este secretată de neuron. După ce Geren descoperă că mielina este secretată de celule specializate, s-a explicat de ce teaca de mielina are o structură similară cu a altor membrane, dat fiind că am văzut că modul în care aceasta se dezvoltă presupune comprimarea unor straturi membianare succesive în jurul axonului. Mielina se

diferenţiază de alte membrane prin raportul mare dintre lipide (70 – 80% din masa uscată a mielinei) şi proteine (20 – 30%). Conţinutul mare de lipide aste explicabil, dacă luăm în calcul rolul de izolator electric al mielinei. Se ştie că lipidele sunt o clasă de molecule hidrofobe, care sunt solubile doar în solvenţi organici ca alcoolul sau benzenul.

Lipidele care intră în constituţia mielinei nu sunt, spre deosebire de proteinele mielinice, specifice acesteia, ele fiind reprezentate de molecule distribuite şi în alte membrane, cum ar fi lipidele neutre, fosfogliceridele şi stângolipidele. Distribuţia cantitativă a lipidelor mielinice variază de la o specie la alta (vezi: Norton & Cammer, 1984), dar nu şi cu vârsta individului. Colesterolul reprezintă circa 20 – 30% din totalul de lipide din SNP, acesta având, probabil un rol în stabilizarea şi comprimarea membranelor celulelor secretoare de mielină, sub forma tecii de mielină (Yatee & Wherrett, 1974; Destering & Wells, 1976). Stângolipidele reprezintă 10 – 35% din totalul de lipide din SNP, faţă de mielina din SNC unde reprezintă numai 3 – 8% din lipide. O specie de stângolipide cu un rol mai bine specificat sunt gangliosidele. Am văzut în capitolul anterior că aceste lipide sunt secretate de neuroni mai ales în perioada creşterii axonului, nu şi în perioada dezvoltării arborelui dendritic, fapt mai uşor explicabil acum ca şi un posibil semnal al axonului pentru declanşarea mielinizării. Mielina este foarte bogată şi în acizi graşi cu lanţ foarte lung o18 atomi de carbon), dintre care cel mai abundent este acidul lignoceric (Heape & colab., 1987).

Cel puţin 60% din proteinele constitutive ale tecii de mielină din SNP sunt glicoproteine, iar proteinele de bază acoperă circa 20 – 20% din totalul de proteine. În SNC, glicoproteinele reprezintă un component minor al mielinei. Dintre glicoproteinele specifice mieline: –, cu masă moleculară mică, amintim glicoproteina de 28 kDa numită proteina zero (P0) şi o alta cu greutatea moleculară de 22 kDa, numită PAS *II (peripheral myelin protein II).* P0 are rol de moleculă de adeziune celulară şi este localizată numai în celulele Schwann secretoare de mielină, nu şi în celulele gliale din SNC, nici în alte tipuri de celule gliaie, altele decât cele secretoare de mielină, din SNP (de ex., celule satelit; vezi: mai jos) (Brockes & colab., 1980). PAS II nu este prezentă numai în mielina din SNP, ci şi în alte ţesuturi, cum ar fi inimă, plămâni, creier (Manfiletti & colab., 1990).

Glicoproteine cu greutate moleculară mare sunt, de pildă, periaxina (170 kDa), glicoproteina asociată mielinei (100 kDa) şi o altă glicoproteina numită MAG, descrisă mai întâi la mielina din SNC (Kitamura, Suzuki & Uyemura, 3 976; Shuman, Hardy & Pleasure, 1983; Quarles, Everly & Brady, 1973). Periaxina este denumită după localizarea sa predominantă, adică în membrana periaxonală a celulei Schwann. MAG este localizată în membranele periaxonale Schwann, în

mezoaxonii externi şi interni, în părţile laterale ale unui segment internodal de mielină şi în incizurile Schmidt-Lanterman (Sternberger & colab., 1979). Această moleculă se leagă de anumite ganglioside de pe suprafaţa axonală şi participă la adeziunea celulă Schwann-axon. MAG are şi rol în menţinerea integrităţii structurale a tecii de mielină întrucât se poate lega şi de tubulină, o proteină structurală a microtubulilor (Heape & colab., 1998). PO, MAG şi PAS II sunt proteine integrale ale membranei. O altă glicoproteină cu rol în adeziunea dintre celulele Schwann şi axon, pe lângă PO şi MAG, este E-caderina care se găseşte în cantităţi mici în mielină din SNP (Fannon & colab., 1995). Implicarea căderinelor în adeziunea celulă Schwann-axon a fost sugerată de unele experimente în care mielinizarea axonilor unor neuroni izolaţi din SNP şi menţinuţi în cultură era perturbată în medii de cultură din care lipsea calciul. Se consideră că E-caderina stabilizează reţeaua glială pentru a se putea forma teaca de mielină.

Pe lângă glicoproteine, atât mielină din SNP, cât şi cea din SNC includ şi proteine de bază, cum ar fi proteinele de bază ale mielinei (MBP, *myelin basic protein).* MBP participă alături de glicoproteină PO la menţinerea liniilor dense (membrane succesive comprimate) prin rolul pe care se crede că îl joacă în comprimarea tecii de mielină, cel puţin în SNP (Martini & colab., 1995). Proteina P2 este specifică sistemului nervos şi poate fi localizată mai ales în partea citoplasmică a membranelor Schwann comprimate (London, 1971; vezi: Nārāyanan & colab., 1988). Ea nu este o proteină de bază, ci o proteină cu mare afinitate pentru acizii graşi, cum ar fi acidul oleic sau acidul retinoic (Uyemura & colab., 1984), având, probabil, funcţia de transportor al unor lipide şi contribuind la asamblarea, remodelarea şi menţinerea mielinei.

Tabel V.2

Caracteristicile proteinelor componente ale mielinei (după Garbay & jeolabi, 2000) % total Masă mol. Localizarea proteinei Localizarea

Glicoproteine
PO
PAS Îi
MAG
Periaxină
E-caderină proteine
50 – 70
2 – 5 1 5 <O.5
(kDa)
(linii jdejisie/u-ajgiejuojdlice)
genei (om)
28
22
100
170
130
linii dense 1. dense
1. intraperiodice 1. intraperiodice 1. intraperiodice cromozomul! or. 17 or. 19 or. 7* 16

Protein e de bază MBP	5 – 15	14 – 21	5 dense	1. or.
P2	1 – 10	14. 8	1. dense	or.

— Localizare cromozomială la şoarece. Nu există date disponibile la om.

Şi alte proteine intră în structura mielinei, dar nu intenţionăm să oferim o prezentare exhaustivă a structurii acesteia (pentru aceasta, trimitem la sinteze recente, cum ar fi: Garbay & colab., 2000; vezi şi: **Tabelul V.2).** Sigur, acest paragraf poate ilustra excelent contribuţia reducerii unui proces de dezvoltare

275

nervoasă cum ar fi mielinizarea la limbajul universal al biochimiei. Scopul nostru a fost, însă, de a instrumenta mai degrabă prezentarea factorilor moleculari care influenţează mielinizarea.

5.3 Originea, diferenţierea şi migrarea celulelor secretoare de mielină

La vertebrate, cea mai mare parte a SNP provine din crestele neurale. Celulele gliale derivate din această linie celulară se clasifică în celule Schwann care sunt celule secretoare de mielină ce înconjoară axonii neuronilor din SNP, celule satelit, celule asociate corpului celular al neuronilor din ganglionii periferici şi, al treilea tip de celule gliale, celulele gliale enterice (Le Douarin, 1986; Fraser & Bronner-Fraser, 1991). Dezvoltarea celulelor Schwann şi a mielinizării implică trei etape: generarea progenitorilor celulelor Schwann din celulele crestelor neurale care au fost delaminate şi au migrat pe cale ventrală (vezi: capitolul 2" şi Bronner-Fraser, 1986), apoi, începerea diferenţierii în celule Schwann (ia şobolan, de la ziua embrionară E 14) şi, în final, finalizarea diferenţierii prin maturarea fenotipului acestor celule în secretoare sau non-secretoare de mielină (-E, 15-E 17). La începutul diferenţierii, progenitorii celulelor Schwann diferă prin morfologie, traseu de migrare, rată apoptotică şi fenotip molecular atât de celulele crestelor neurale, cât şi de celulele Schwann mature, complet diferenţiate. La finalizarea diferenţierii acestora, se consideră că ar fi crucială prezenţa unor factori de creştere ca factorul de creştere glial (GGF, *glial growth factor)* şi heregulina sau ARIA (pentru detalii, vezi: Dong & colab., 1995). O celulă Schwann matură trebuie să exprime molecule specifice, cum ar fi glicoproteinele MAG sau, mai spre sfârşitul diferenţierii, PO. La acest proces de diferenţiere participă şi axonul la care celula urmează să adere, fapt indicat pentru prima dată de A.J. Aguayo, cel care a condus experimentele deja discutate despre diferenţele capacităţii de regenerare dintre SNC şi SNP. Despre factorii care influenţează mielinizarea vom vorbi în continuare şi într-un paragraf următor.

Cele trei clase de celule gliale specifice SNC sunt oligodendrocitele, responsabile de mielinizare şi astrocitele, celule cu rol mai ales trofic şi de transport, alături de microglie (pentru o introducere, vezi: Olteanu & Lupu, 2000, pp. 36 – 39, dar şi: Lim & Alvarez-Buylla, 1999). Măcar o parte dintre astrocite provin din celulele gliale radiale care se diferenţiază la sfârşitul neurogenezei (Levitt & Rakic, 1980), dar originea oligodendrocitelor a rămas până de curând neelucidată.

Sistemul experimental în care a fost investigată această

problemă este reprezentat de măduva spinării, datorită populaţiilor de neuroni cu funcţie şi localizare specifică. Unele studii au sugerat că celulele gliale radiale din măduva spinării ar putea da naştere direct la oligodendrocite, iar altele au oferit unele dovezi prin care se arăta că celulele din vecinătatea canalului central (ependimal) ar fi progenitori restricţionaţi pentru a forma fie oligodendrocite, fie astrocite, aceştia

urmând să migreze spre regiuni periferice ale măduvei spinării unde ar prolifera şi s-ar diferenţia (Choi & Kim, 1985; Fujita, 1965; Gilmore, 1971).

Primele cercetări care au indicat originea oligodendrocitelor exclusiv din regiunea ventrală a măduvei spinării au fost studii *in vitro* în care celule din regiunile ventrale, dar nu şi cele din regiunile dorsale ale măduvei spinării au dat naştere la oligodendrocite (Warf, Fok-Seang & Miller, 1991). Precursorii din această zonă au o dinamică celulară foarte mare şi migrează în mai puţin de 18 h în coloanele dorsale ale măduvei spinării. Un studiu relativ recent a confirmat că, între zilele embrionare E 16.5 şi E 18.5 la şobolan, în zona ventrală a măduvei spinării (în partea dorsală faţă de linia mediană ventrală) se găseşte o populaţie mixtă de precursori ai oligodendrocitelor şi astrocitelor care dă naştere la progenitori care migrează lateral şi dorsal în substanţa albă a măduvei spinării în dezvoltare (Noii & Miller, 1993). Odată cu migrarea progresivă a acestor progenitori, se pare că populaţia de precursori scade. Nu este de mirare că oligodendrocitele şi astrocitele au precursori comuni în zona ventrală a măduvei spinării, din moment ce au fost identificate celule considerate progenitori bipotenţi (O-2A), care pot genera ambele tipuri de fenotipuri de celulă glială (Raff, Miller & Noble, 1983).

Oligodendrocitele provin dintr-o populaţie de precursori situaţi în zona ventrală şi la nivelul trunchiului cerebral, diencefalului şi telencefalului, ca şi *în* măduva spinării (Timsit & colab., 1992; Spassky & colab, 1998). Ele sunt situate la toate aceste niveluri ale neuraxului deasupra liniei mediene ventrale, ceea ce ar putea sugera un rol pentru proteina SHH secretată de placa podelei în specificarea oligodendrocitelor. Într-adevăr, diferenţierea oligodendrocitelor în telencefal este dependentă de semnalizarea unor proteine din familia *hedgehog* (HH). Diferenţierea oligodendrocitelor este asociată cu iniţierea expresiei unor factori de transcripţie, cum ar fi *Olig-*\, *Olig-2*

şi iS qx – IO. Activarea acestui fenotip este controlată de prezenţa proteinelor HH în telencefalul bazai (Nery, Wichterle & Fishell, 2001; Tekki-Kessaris & colab., 2001). Aceasta sugerează că oligodendrocitele care efectuează mielinizarea neuronilor din cortexul cerebral provin din telencefalul bazai, probabil, din emineţa ganglionară medială, fapt sugerat de curând de J.J. Parnavelas (Parnavelas, 2000; vezi şi: Spassky & colab., 2000). Oricum, şi celulele prelevate din cortexul cerebral al şobolanilor în ziua embrionară E 15.5, pot să genereze oligodendrocite, dar numai în culturi de lungă o4 diviziuni), nu şi de scurtă durată (vezi: Tekki-Kessaris & colab., 2001).

Un studiu al lui P. Murphy şi al colaboratorilor (1996) a investigat rolus unui factor de transcripţie de tip *deget de zinc,* numit *Krox-20,* care se pare că este implicat în diferenţierea celulelor Schwanr. La şoareci, mutaţia nulă a acestui factor de transcripţie se asociază cu perturbarea mielinizării prin arestarea celulei Schwann într-o fază iniţială de diferenţiere, aceasta exprimând molecule „timpurii" cum ar fi MAG, dar nu şi markeri târzii ca P0 (Topilko & colab., 1994). *Krox-20* este exprimat la început (de la E 10.5 până la E 14.5, la şoarece) numai în rădăcinile senzitive şi motorii ale nervilor spinali şi craniali, nu şi în ganglioni sau în porţiunile mai distale ale acestor nervi, excepţie de la acest program de

exprimare diferenţiată spaţio-temporai făcând numai nervul cranial XI. De la EI 15.5, *Krox-20* începe să fie exprimat pe toată lungimea nervilor, dar doar în celulele Schwann care, în această perioadă, îşi încep diferenţierea (Schneider-Maunoury & colab., 1993). Înainte de această perioadă, se consideră că celulele Schwann nu au capacitatea de a răspunde selectiv la semnalele axonilor. Ca o dovadă, progenitorii bipotenţi O-2A proliferează în prezenţa unor factori derivaţi din neuroni, dar şi astrocite, în timp ce oligodendrocitele la începutul diferenţierii mai pot prolifera numai ca răspuns la factori mitogeni derivaţi din neuroni (vezi: Gard & Pfieffer, 1990).

CSrn prols

Fig. 5.4 *Reprezentare schematică a dezvoltării şi diferenţierii celulelor Schwann (CS) şi celulelor satelit (Cs) din precursorii reprezentaţi de celulele crestelor neurale (CN). Transdiferenţierea celulelor satelit în celule Schwann este ipotetică, susţinută de observaţii in vitro la culturi de celule satelit.* A, axon; pro CS, pro Cs, progenitori ai

celulelor Schwann, respectiv, celulelor satelit; CSM, celulă Schwann mielinizată; N, nucleu. (Modificat după Murphy & colab., 1996)

Ceea ce este cert este că, aşa cum au indicat Aguayo şi colaboratorii, finalizarea diferenţierii celulei Schwann în celulă secretoare de mielină depinde de semnalizarea continuă dintre aceasta şi axon pentru că absenţa acestuia din urmă determină pierderea fenotipului molecular specific celulelor Schwann secretoare de mielină (PO/MBP/MAG). Retragerea axonului din cultură sau blocarea semnalizării sale către celula Schwann determină dediferenţierea acesteia din urmă. Expresia *Krox-20* apare numai în celulele Schwann care au aderat deja la un axon (Murphy & colab., 1996). Expresia acestui factor de transcripţie este influenţată şi de facilitarea creşterii nivelului intracelular de adenozin-monofosfat ciclic (AMPC) prin adăugarea în cultură, de pildă, a unor agenţi cum ar fi forskolina, dar adeziunea homofilică a celulei Schwann cu axonul induce, totuşi, expresia cea mai stabilă a *Krox-20.* Un experiment interesant a fost efectuat pe culturi de celule izolate din ganglionul rădăcinii dorsale care conţine celule satelit ce devin, imediat ce sunt plasate în cultură, celule Schwann. Dacă acestea sunt prelevate după E 15.5 de la şoarece, ele pot exprima, odată cu tranziţia spre fenotipul Schwann, şi *Krox*

20. Tubul neural pare să secrete un factor care, prin difuziune, participă la inducţia expresiei *Krox-20* în celulele satelit diferenţiate în celule Schwann. Acest factor difuzibil este, cel mai probabil, factorul de creştere glial (GGF, *glial growth factor).* Concluzia acestor experimente este că reglarea expresiei *Krox-20* este relaţionată cu trei etape ale mielinizării: maturarea celulelor Schwann din precursorii lor, apoi, transdiferenţierea posibilă, depinzând de condiţiile de mediu celular (de ex., prezenţa GGF), a celulelor satelit în celule Schwann şi semnalizarea axonală, care iniţiază programul de mielinizare (Murphy & colab., 1996; Fig. 5.4).

5.3.1 Stadiile mielinizării

Finalizarea diferenţierii celulelor Schwann poate fi discriminată prin schimbări specifice ale morfologiei acestora. Celulele Schwann mature pe care, datorită faptului că secretă mielină, le vom numi celule „promielinizante", sintetizează membrana bazală descrisă de R. Bunge şi stabilesc o relaţie de 1: 1 cu segmente de axon. Celule

promielinizante sunt considerate celulele care nu au început însă biosinteza de mielină, înfăşurarea tecii de mielină sau comprimarea acesteia (Martin & Webster, 1973). Diferenţa este semnificativă funcţional pentru că aceste celule promielinizante se mai pot diviza, în timp ce cele care au început să „ruleze" programul de mielinizare sunt celule care s-au retras din ciclul celular. Studii cantitative efectuate la şobolan au indicat că celulele promielinizante sunt cel mai numeroase imediat după naştere, urmând ca numărul lor să scadă progresiv, până în a doua săptămână de viaţă postnatală, pe măsură ce aceste celule îşi finalizează diferenţierea (Friede & Samorajski, 1968). În timpul dezvoltării nervoase, proliferarea şi diferenţierea oligodendrocitelor este reglată în aşa fel încât, în fiecare regiune a sistemului nervos, acestea să se matureze la un anumit moment. Astfel, la şobolan, de pildă, în nervul optic, oligodendrocitele apar înjurai momentului naşterii, în timp ce în măduva spinării apar în ziua embrionară E 17 (Warf, Fok-Seang & Miller, 1991).

Un fapt fascinant, descoperit relativ de curând, este că în primul rând contactul cu axonul determină iniţierea unui val de apoptoză în rândul celulelor Schwann. Trecerea de la faza promielinizantă la cea mielinizantă marchează deci o etapă de susceptibilitate a celulei Schwann la apoptoză. Apoptoză este menită pentru ca numărul celulelor Schwann mielinizante şi axonii care trebuie mielinizaţi să fie corespunzător. Acest proces stabileşte corespondenţa funcţională de o celulă Schwann/segment de axon. Cum induce contactul cu axonul această apoptoză a celulelor Schwann? S-a arătat că axonul oferă celulei Schwann factori de creştere indispensabili pentru trecerea de la faza promielinizantă la faza mielinizantă. Acest factori fac parte din familia neuregulinelor, în care este inclus şi factorul de creştere glial (GGF). Neuregulinele sunt exprimate specific în neuroni ai căror axoni intră în constituţia nervilor periferici. Retragerea acestora din culturile de celule Schwann declanşează apoptoză masivă a acestora, observându-se trecerea celulei Schwann de la morfologia normală elipsoidă la o morfologie sferoidă, cu condensarea cromatinei şi fragmentarea nucleară (Syroid & colab., 1996).

Aceşti factori de creştere determină modificarea în trei timpi a fenotipului molecular al celulei Schwann, corespunzând trecerii de la faza promielinizantă la cea mielinzantă. Doi factori de transcripţie sunt

specifici. Primul este numit SCIP, care este indus de contactul celulei Schwann cu axonul atât timp cât celula se mai poate divide, dar expresia sa este reprimată rapid odată ce celula începe să mielinizeze (Zorick & colab., 1996). Celălalt factor de creştere este *Krox-20* care ştim că este mai specific fazei mielinizante.

Rolul SCIP a fost investigat mai întâi la fenotipul homozigot. SCIP-deficient, la care celulele Schwann rămân temporar în perioada promielinizantă, dar efectuează apoi o mielinizare relativ normală ca aspect (Jaegle & colab., 1996). Celulele Schwann exprimă secvenţial aceşti doi factori de transcripţie: iniţial, celulele exprimă doar SCIP (SCIP + /. fom-20), apoi, exprimă şi SCIP, şi *Krox-20* (SCIP4*/Krox-20 +)*, după care, odată cu faza promielinizantă, celulele reprimă expresia SCIP, iar *Krox-20* este în continuare exprimat (SCIP7 Î>o; c-20 +) (Blanchard & colab., 1996). Scenariul cel mai simplu ar presupune că chiar *Krox-20* reprimă gradual expresia SCIP. Această ipoteză nu s-a verificat însă. SCIP dispune de un mecanism prin care se autoreprimă, dar acest proces este posibil numai când celula Schwann începe să exprime şi *Krox-20,* ceea ce sugerează că cei doi factori de transcripţie au un mecanism de control molecular comun. Celulele care nu exprimă *Krox-20* nu se retrag din diviziune şi proliferează rapid, formând o populaţie de celule Schwann supranumeroase, aproximativ de 5 ori mai multe celule decât la heterozigoţi (şoareci cu fenotipul *Krox-20 + I)* sau şoareci normali. Această populaţie supranumeroasă de celule Schwann este de – 16 ori mai susceptibilă la apoptoză faţă de cea de la şoarecii normali (Zorick & colab., 1999). Ceea ce ne relevă aceste analize este că SCIP nu este esenţial pentru finalizarea diferenţierii celulelor Schwann, dar este important pentru controlul tranziţiei de la faza promielinizantă la cea mielinizantă prin legarea deşi „dezasamblarea" unei părţi a aparatului transcripţionai. Deci faza mielinizantă este definită de fenotipul SCIP7. & m-20", iar cea mielinizantă de fenotipul SCIP7 i & r>; t-20 +, fenotipul intermediar care presupune expresia ambilor factori de transcripţie însemnând că celula trece la faza de mielinizare, dar mai rămâne un timp în proliferare (Zorick & colab., 1999). Sau, cu o formulă contrasă, dacă exprimarea SCIP este importantă iniţial pentru intrarea în faza promielinizantă, reprimarea sa subsecventă este esenţială pentru ieşirea din această fază de diferenţiere şi trecerea în următoarea.

În cazul oligodendrocitelor, se ştie că diferenţierea acestora este

blocată de acidul retinoic. Alţi factori, cum ar fi factorul de creştere derivat din plăcuţe (PDGF, *plateletderived growth factor),* nu au aceeaşi acţiune. FGF8, în schimb, promovează proliferarea, dar blochează diferenţierea progenitorilor oligodendrogliali din măduva spinării. Dacă ne gândim că morfogeneza şi regionalizarea timpurie a sistemului nervos este, în mare parte, dependentă de semnalizarea mediată de FGF8 de la nivelul organizatorilor secundari, este verosimil să presupunem că acidul retinoic secretat mai ales de placa podelei din tubul neural, acţionează în acea perioadă în care acţiunea morfogenă a FGF8 este masivă, amânând diferenţierea oligodendrocitelor. Ulterior, după expansiunea

masivă şi specificarea timpurie a sistemului nervos, concomitentă cu scăderea nivelului de acid retinoic, progenitorâi oligodendrogliali sunt expuşi la acţiunea unor surse de FGF 8 mai discrete, putându-se diferenţia (Noii & Miller, 1994). Acesta este un scenariu plauzibil, dar nu este exclusă intervenţia altor factori asupra diferenţierii oligodendrocitelor. Blocarea diferenţierii sub acţiunea acidului retinoic pare să coincidă cu facilitarea migrării, fapt care nu poate fi întâmplător dat fiind că mai ales progenitorii oligodendrogliali în faze timpurii ale diferenţierii afişează o motilitate marcată (vezi: Pfieffer, Warrington & Bansal, 1993). Migrarea progenitorilor oligodendrogliali este crucială pentru mielinizare. Ca să dăm numai câteva exemple, să ne gândim că oligodendrocitele care efectuează mielinizarea nervului optic îşi au originea în creier, la nivelul chiasmei, iar progenitorii din măduva spinării, cu origine în zona ventrală, trebuie să migreze lateral şi dorsal în substanţa albă (vezi: Small, Riddle & Noble, 1987; Noii & Miller, 1993).

5.3.2 Motilitatea şi migrarea progenitorilor celulelor secretoare de mielină

Numeroase studii au arătat că progenitorii oligodendrocitelor sunt foarte motili şi migrarea lor este influenţată de factori legaţi de adezivitatea substratului şi gradiente. chemotactice (Kiernan & ffrench-Constant, 1993; Armstrong, Harvath & Dubois-Dalcq, 1990). Motilitatea progenitorilor corelează cu alinierea reţelei de actină în celulă şi cu prezenţa în cantităţi marcate a unei proteine care se poate lega de actină, numită gelsolină *(gelsolin).* Gelsolina favorizează, remodelarea citoscheletului de actină, aceasta putând avea efecte

asupra distribuţiei unor proteine, cum ar fi canalele ionice (Kajikawa & colab., 1991; Levina, Lew & Brent Heath, 1994).

Un studiu provocator a fost elaborat de A. Webb şi colaboratorii (1995), prin care s-a investigat influenţa directă a topografiei substratului, în absenţa eterogenităţii mecanice şi chimice. Această echipă a testat comportamentul migrator al progenitorilor oligodendrogliali (O-2A) cultivaţi pe substraturi plasate pe discuri fabricate din cuarţ, cu striaţiuni longitudinale măsurând fie câţiva micrometri (substrat fin), fie câţiva nanometri (substrat ultrafin). Migrarea celulelor O-2A s-a făcut paralel cu striaţiile fine, această regularitate de migrare fiind respectată şi mai bine de progenitorii plasaţi pe substratul ultrafin. Migrarea paralelă, orientată întotdeauna după contururile substratului şi, respectiv, morfologia orientată radial a progenitorilor sunt similare cu comportamentul celulelor O-2A din nervul optic. Celulele au răspuns optim mai ales pe substraturile care simulau topografia pe care progenitorii oligodendrogliali o găsesc în nervul optic al şobolanului la P 7 (Webb & colab., 1995).

Dovezi cum că progenitorii, în general, beneficiază de ghidare şi prin simpla topografie a axonilor învecinaţi sunt din ce în ce mai numeroase. Ipoteza este plauzibilă, în primul rând, pentru că organizarea paralelă a fibrelor în nervul optic ar putea ghida progenitorii O-2A pe o axă unidirecţională, spre retină, prin contact celular, alături de influenţe chimice, mecanice sau semnalizarea specifică

populaţiei de progenitori ce urmează să migreze. În al doilea rând, organizarea! longitudinală a axonilor facilitează îndepărtarea progenitori lor de populaţia I proiiferativă. În al treilea rând, mielinizarea diferenţiată ar putea fi indusă pe I traseele specifice ale progenitorilor celulelor secretoare de mielină. Dar moleculele I de adeziune s-ar putea să nu garanteze singure o asemenea specificitate, la aceasta I putând participa contururile mănunchiului de axoni. Studiile lui P. Clark au arătat I că şi neuronii din cortexul cerebral de la găină răspund printr-o migrare organizată I la un substrat regulat cu şanţuri late de – 8 um şi adânci de – 2 um (Clark & colab., I 1990). Topografia substratului ar putea afecta direcţia de migrare a celulei fie prin I acţiunea directă asupra citoscheletului, aşa cum am notat mai sus, fie prin I redistribuirea unor proteine membranare care ar putea

iniţia cascade de semnalizare I cu efect asupra organizării citoscheletice.

5.3.3 Geometria substanţei albe

Odată cu mielinizarea, circuitele sistemului nervos îşi modifică structuraşi I funcţiile. Ca să abordăm problema de departe, într-un experiment clasic pe care deja l-am expus, S. David şi A.J. Aguayo confirmau că există o diferenţă fundamentală în ceea ce priveşte capacitatea de regenerare între SNP şi SNC. Ei sugerau că această diferenţă s-ar putea datora şi faptului că, în SNC, reţeaua mai complicată de oligodendrocite care extinde numeroase procese şi mielinizează mai mulţi neuroni, faţă de organizarea şi corespondenţa dintre celulele Schwann şi axonii neuronilor din SNP, reprezintă un substrat mai puţin permisiv pentru regenerarea neuronilor (David & Aguayo, 1981).

Ideea s-a confirmat indirect, fiind susţinută de corespondenţa dintre sfârşitul perioadei în care SNC, în particular, măduva spinării, se poate regenera şi începerea mielinizării. La embrionul de găină, dacă măduva spinării toracică este secţionată înainte de ziua embrionară E 13, această leziune neuroanatomică se recuperează prin regenerarea completă a axonilor secţionaţi ce corelează şi cu recuperarea funcţională (locomotorie). În schimb, dacă aceeaşi secţiune este efectuată după E 13, regenerarea axonală şi, implicit, recuperarea funcţională nu mai sunt posibile. Deci, sistemul nervos trece printr-o perioadă iniţială permisivă pentru regenerarea nervoasă, până la E 13, după care intră într-o perioadă de regenerare restrictivă. Se pare că, măcar pentru sistemul nervos, ziua de 13 este cu ghinion!

Trecerea de la perioada permisivă la cea restrictivă corespunde cu perioada în care începe mielinizarea sistemului nervos central. Într-adevăr, mielinizarea semnalizează reducerea capacităţii de regenerare a SNC. Întârzierea începerii mielinizării până la – E17 prin mijloace imunologice prelungeşte perioada permisivă, astfel că secţiuni ale măduvei spinării toracice la embrionul de găină la E 15 se asociază cu regenerarea completă (Keirstead & colab., 1992). Caracterul represiv al mielinei pentru regenerarea axonală se explică prin influenţa inhibitoare pentru creşterea axonilor a unor proteine constitutive ale mielinei, cum ar fi glicoproteinele asociate mielinei (Mukhopadhyay & colab., 1994).

În creierul fetal uman, au fost identificate oligodendrocite în trei faze de diferenţiere, numite preoligodendrocite (pre – OL), cu morfologii mai diverse şi, de aici, în stadii de diferenţiere diferite, apoi, oligodendrocite imature, deja cu o morfologie multipolară şi oligodendrocite mature. Progenitorii oligodendrocitelor (pre – OL) predomină în cortexul cerebral şi substanţa albă cerebrală încă de la 18 săptămâni gestaţionale şi până la jumătatea gestaţiei (Back & colab., 2001; FIG. 5.5). În măduva spinării, aceştia au fost identificaţi încă de la 6 săptămâni. În creier, până la 18 săptămâni, celulele de tip pre – OL încep să fie distribuite în substanţa albă. Între 18 şi 27 de săptămâni, oligodendrocitele imature reprezintă numai o populaţie minoritară de celule, prezentă numai în substanţa albă. La – 30 de săptămâni, numărul oligodendrocitelor imature creşte numai în substanţa albă. În această perioadă, începe şi mielinogeneza limitată iniţial la substanţa albă periventriculară, dar tubii mielinici devin vizibili la microscopul optic de-abia de la 2 – 4 luni postanatal (Kinney & colab., 1989).

ZV
bÂP
SAM
SAS

Fig. 5.5 *Distribuţia progenitorilor în curs de diferenţiere în oligodendrocite în zona ventriculară (ZV), substanţa albă profundă (SAP), mediană (SAM) şi superficială (SAS) din telencefalul uman la 18 săptămâni. B, oligodendrocită multipolară, în curs de diferenţiere.* (Adaptat după Back & colab., 2001, cu permisiunea autorilor)

5.3.4 Modificări ultrastructurale în axonul mielinizat

Mielinizarea în sistemul nervos este asociată cu reglarea fosforilării neurofilamentelor care sunt abundente în axoni (Fig. 5.6). Neurofilamentele sunt structuri filamentoase compuse din trei subunităţi, NF-L, NF-M şi NF-H, cu mase moleculare de 70, 150 şi, respectiv, 200 kDa (Shaw & Weber, 1982). Neurofilamentele fosforilate sunt organizate paralel în axoni, conectate prin punţi transversale, în timp ce neurofilamentele în stare nefosforilată sunt mai puţine, se găsesc numai în regiunile somatodendritice, fiind mai puţin organizate şi cu mai puţine punţi transversale (Fig. 5.7B).

Ca dovadă. că mielinizarea participă la organizarea

citoscheletului axonului, în particular, prin facilitarea fosforilării neurofilamentelor, există studii efectuate la diferite fenotipuri asociate cu demielinizare. Astfel de fenotipuri la care este parţial sau total blocată mielinizarea, dar oligodendrocitele se pot diferenţia în diverse stadii, sunt *shiverer* (engl., *to shiver* = a tremura), *jimpy* (engl., *tojump* = a sări) şi *quaking* (engl. *to quake* = a tremura) (descrise de: Chernoff, 1981; Meier & MacPike, 1970, respectiv, Sidman, Dickie & Appel, 1964). La cele trei fenotipuri se asociază mutaţii ale proteinelor de bază ale mielinei (MBP), proteinei proteolipidice a mielinei, respectiv, a unei proteine încă necunoscute (Roach & colab., 1983; Phillips, 1954; Campagnoni, 1988).

FIG. 5.6 *Imagine electronmicroscopică a unor axoni mielinizaţi din măduca spinării de la şoarece. Se pot observa tecile de mielină în jurul axonilor. precum şi neurofilamente (săgeţi), microtubuli (capete de săgeţi) şi mitocondrii (M), precum şi porţiuni citoplasmatice care nu conţin nici neurofilamente, nici microtubuli.* (Adaptat după Gotow & colab., 1999, cu permisiunea autorilor)

S-a observat că axonii demielinizaţi de ia şoarecii cu fenotipul *jimpy* prezintă neurofilamente mai dense şi aliniate mai neregulat, cu punţi transversale mai puţin dezvoltate (Gotow & colab., 1999; Fig. 5.7 C). Deci mielinizarea este un program care influenţează nu numai proprietăţile funcţionale ale axonului, ci şi ultrastructura sa. O posibilă cale prin care mielinizarea ar putea determina fosforilarea neurofilamentelor presupune semnalizarea transmembranară de la teaca de mielină normală, care ar modula balanţa dintre activitatea unor enzime din axon, în particular, kinazele şi fosfatazele, modificând astfel nivelul de fosforilare al proteinelor din care sunt compuse neurofilamentele, şi al altor proteine (de Waegh, Lee & Brady, 1992; Cole & colab., 1994). Fosforilarea neurofilamentelor modifică şi calibrul axonilor, participând, deci, la creşterea neuronală. Astfel, numai segmentele de axon contactate de o oligodendrocită suferă acumularea de neurofilamente şi mărirea calibrului. Se pare că numai prezenţa oligodendrocitelor, deci, semnalizarea mediată de acestea, în contact cu axonul, este necesară pentru creşterea acestuia din urmă. Începerea mielinizării facilitează mărirea calibrului axonal, dar nu este indispensabilă acestui proces de creştere (Sánchez & colab., 3996).

R \ *V*

…

— i = y; >ţ:

„… „… y. \…

—: …).*)* – *r:*

Fig. 5.7 *Organizarea citoscheletului axomdui (a) şi, în particular, organizarea neurofilamentelor (B, C). A, schemă a citoscheletului coconului, în care se observă sunt indicaţi microtubulii (MI), axolema (a), mitocondriile (M), neurofilamente (NF), sistemul microtrabelular (SUNT), reticulul axoplasmatic (RA), lizozomi (L), micro filamente de actină (MA) şi pachete de transport axoplasmatic sau vezicule (V). C, la şoarecele normal, neurofilameniele (săgeţi) sunt aliniate regulat şi organizate paralel şi conectate prin punţi transversale (capete de săgeată). C, la şoarecii cu fenotipul jimpy, neurofilamentele sunt organizate neregulat, aşezate, uneori, vertical pe vezicule şi cu foarte puţine punţi transversale.* B, C, bară la scală: 5 um. (A, Modificat după Schwartz, 1980; B, C, Adaptat după Gotow & colab., 1999, cu permisiunea autorilor)

5.4 Factori care influenţează direct mielinizarea

Mielinizarea este un proces de dezvoltare care implică atât neuronul, cât şi celula glială, fie ea celulă Schwânn sau oligodendrocită, printr-o serie de interacţiuni neuronal-gliale ce controlează diferitele etape ale mieâinizării (Lemke, 2001). S-a arătat că iniţierea mieâinizării necesită, cel puţin în cazul celulelor Schwann, contactul direct al celulei secretoare de mielină cu axonul. Celulele Schwann, spre deosebire de oligodendrocite, nu secretă mielină în culturi din care lipsesc axonii (Mirsky & colab., 1980; Salzer, Bunge & Glaser, 1980). De aici.

2 Ş5

printre factorii incriminaţi ca având o influenţă directă asupra mielinizării, cei mai studiaţi au fost activitatea electrică spontană sau evocată a neuronului la care celula secretoare de mielină aderă, neurotrofinele şi unele molecule cum ar fi moleculele de adeziune.

S-a observat că există diferenţe semnificative între descărcările neuronilor aflaţi în fazele de premielinizare, respectiv, în timpul mielinizării (Fields, 1998). Neuronii din ganglionul rădăcinii dorsale de la şoarece înregistrează descărcări spontane imediat ce terminalele axonice ajung la periferie, chiar înainte ca acestea să formeze sinapse

(Fitzgerald, 1987). Aceşti neuroni au activitate electrică spontană numai prenatal, nu şi postnatal, ceea ce atrage atenţia asupra unui posibil rol al acestora în procese de dezvoltare cum ar fi mielinizarea. Iniţial, neuronii din ganglionul rădăcinii dorsale descarcă impulsuri cu frecvenţă mică (<O.5 Hz) pentru ca această rată spontană de descărcare să crească (1 – 10 Hz) până spre ziua embrionară E 19 la şoarece (Fitzgerald & Fulton, 1992). Această modulare a ratei de descărcare spontană a neuronului are efecte în primul rând asupra moleculelor de adeziune, una din acestea fiind LI, localizată exclusiv în ţesutul nervos, mai ales în neuroni şi celule Schwann şi implicată în fazele iniţiale ale mielinâzării (Wood, Schachner & Bunge, 1990; pentru o sinteză, vezi: Wong & colab, 1995).

R. D. Fields şi colaboratorii au demonstrat că activitatea electrică nu pare să fie indispensabilă pentru declanşarea mielinizării, cel puţin în neuronii din ganglionii rădăcinii dorsale (Stevens, Tanner & Fields, 1998). Rata de proliferare şi numărul celulelor Schwann, ultrastructura axonilor sau grosimea straturilor de mielină nu sunt modificate de stimularea electrică cu impulsuri cu frecvenţă de O.1 Hz sau 1 Hz faţă de condiţia în care neuronii nu au fost stimulaţi. Însă stimularea electrică cu frecvenţă mica (O.1 Hz), similară cu frecvenţa cu care descarcă iniţial neuronii în perioada embrionară şi fetală, reduce mielinizarea cu două treimi faţă de control (nestimulat). Acest efect este mediat de molecula de adeziune il a cărei expresie este reprimată la stimularea electrică a axonului la O.1 Hz. Îl nu este influenţată de stimularea electrică de frecvenţă mai mare (1 Hz), implicarea ei directă în mielinizare fiind confirmată de faptul că, în această condiţie, nici mielinizarea nu este semnificativ modificată faţă de control. De aici rezultă că frecvenţa descărcărilor electrice spontane ale axonului este un factor important pentru mielinizare şi că efectele sale asupra acestui proces sunt mediate de expresia pe suprafaţa axonului a unor molecule de adeziune cum ar fi LI (Stevens, Tanner & Fields, 1998).

Neurotrofinele sunt şi ele implicate direct în efectuarea mielinizării. Aceşti factori trofici pentru neuroni sunt o clasă eterogenă de molecule, a căror secreţie este influenţată în primul rând de activitatea electrică a neuronului. Se consideră – generic, că neurotrofinele promovează supravieţuirea neuronală şi neuroplasticitatea prin interacţiunea cu receptori specifici din clasa

receptorilor tirozin-kinazici (Trk), prezenţi în membrana neuronilor (pentru o sinteză, vezi: Thoenen, 1995). Neurotrofinele au un mecanism de secreţie care le face ideale pentru a juca un rol în declanşarea unor cascade moleculare puse în slujba dezvoltării nervoase. Ne referim aici la un mecanism de feedback prin care

eliberarea de neurotrofine cum ar fi factorul de creştere neuronal (NGF) sau factorul de creştere derivat cerebral (BDNF) determină activarea receptorilor Trk şi, consecutiv, inducerea secreţiei de neurotrofâne (Canossa & colab., 1997).

Un rol posibil al neurotrofinelor în mielinizare a fost sugerat de experimente în care secţionarea unui nerv duce la inducerea rapidă a expresiei NGF şi a receptorului de afinitate redusă pentru neurotrofâne, p75, în partea distală faţă de leziune (Heumann & coiab., 1987). Alte neurotrofâne, BDNF şi neurotrofma 4 (NT-4) sunt induse în segmentul distal al nervului de-abia după 2 săptămâni, iar expresia NT-3 este redusă imediat după leziune şi revine apoi gradual la niveluri normale (Barde, Edgar & Thoenen, 1982; Berkemeier & colab., 1991; Emfors & colab., 1990; Sebert & Shooter, 1993). Se cunoaşte faptul că NT-3 favorizează proliferarea, supravieţuirea şi diferenţierea oligodendrocitelor, că unele neurotrofâne influenţează migrarea celulelor Schwann prin intermediul receptorului p75 şi că BDNF influenţează formarea mielinei în timpul regenerării nervului (Barrès & colab, 1993; Anton & colab., 1994; Zhang & colab., 2000).

J. R. Chan şi colaboratorii (2001) au urmărit expresia celor mai importante neurotrofine în culturi de neuroni şi celule Schwann prelevate din ganglionul rădăcinii dorsale de la şobolan. Ei au observat că faza mielinizantă începe după 2 zile în cultură, în această perioadă nivelurile BDNF fiind semnificative, dar scăzând rapid după 4 zile în cultură, adică după inducţia mielinizării. BDNF contribuie la mielinizare pentru că adăugarea în cultură a acestui factor facilitează expresia unor proteine mielinice cum ar fi MAG şi P0, iar inhibarea expresiei BDNF printr-un antagonist al receptorilor specifici (Trk-B) duce la scăderea sintezei de mielină. *In vivo,* BDNF determină creşterea numărului de axoni care sunt mielinizaţi şi a grosimii straturilor de mielină. Dacă sunt antagonizaţi receptorii Trk-B, mai mulţi axoni rămân nemielinizaţi, procesul fiind blocat într-o etapă premielinizantă. NT-3 însă are un efect inhibitor asupra mielinizării, expresia sa

scăzând gradual până după 5 zile în cultură. Dacă se adaugă în cultură NT-3 chiar în perioada inducţiei mielinizării, acest proces este foarte mult redus. Antagonizarea receptorilor Trk-C, specifici NT-3, restabileşte rata normală de mielinizare (Chan & colab., 2001). Aceste experimente demonstrează că NT-3 are un efect inhibitor în faza premielinizantă, nivelul acestuia scăzând până la inducţia mielinizării, iar BDNF este necesară pentru declanşarea şi desfăşurarea normală a stadiului mielihizant.

Ceea ce putem spune este că semnalizarea axon-celulă secretoare de mielină este indispensabilă pentru producerea mielinizării. Unele cercetări au indicat implicarea unui factor difuzibil în semnalizarea mielinizării (Bolin & Shooter, 1993). Un astfel de factor ar putea fi un neurosteroid ca progesteronul întrucât este sintetizat de celulele Schwann şi stimulează formarea tecii de mielină în culturi de neuroni, dar şi remielinizarea după leziuni ale nervului sciatic (Koenig & colab., 1995). Inhibitori ai sintezei progesteronului inhibă mielinizarea. Progesteronul influenţează expresia unor proteine cum ar fi P0, dar nu şi a altor proteine, ca MAG (Notterpek & colab., 1999). Deşi efectul asupra unei proteine a cărei expresie apare târziu în cursul mielinizării, se pare că progesteronul are

Influenţă asupra semnalizării iniţierii mielinizării şi asupra facilitării sintezei de mielină. Acesta accelerează iniţierea fazei mielinizante, rata sintezei de mielină, fără să afecteze însă cantitatea totală de mielină. Inhibitori ai progesteronului afectează iniţierea mielinizării şi reduc cantitatea de mielină comprimată în fiecare porţiune internodală (Chan, Phillips & Glaser, 1998).

Unii factori de creştere cum ar fi factorul de creştere transformator /? 1 (TGF-/? 1) favorizează proliferarea celulelor Schwann şi creşte în cultură numărul de celule aflate în faza premielinizantă, care exprimă molecula neuronală de adeziune celulară (NCAM) şi receptorul de mică afinitate pentru factorul de creştere neuronal (NGFR) (Einheber & colab., 1995). Aşa cum deja am notat, adenozin-monsofosfatul ciclic (AMPC) este considerat mesagerul de ordinul II implicat în semnalizarea axon-celulă Schwann întrucât favorizează inducerea expresiei proteinei PO, dar numai în culturi în care nu sunt prezenţi factori de creştere (pentru o sinteză, vezi: Mirsky & Jessen, 1996). Cantităţi reduse de AMPC induc

prolifererarea celulelor Schwann, iar niveluri mai ridicate par să influenţeze diferenţierea acestora prin inducerea unor proteine cum ar fi galactocerebrosida (Yamada, Komiyama & Suzuki, 1995).

Semnalizarea axon-celulă secretoare de mielină presupune numeroase semnale, dintre are pe unele nu le vom detalia aici. Scopul acestui capitol este de a da un fundament pentru înţelegerea mielinizării, fapt pentru care am evitat, pe cât posibil, descrierea, pe măsura numeroaselor date experimentale existente, a unor probleme care ţin de biochimia mielinei şi a mielinizării. Într-adevăr, mielinizarea este un proces studiat intensiv de biochimişti, fapt dovedit de numeroasele cercetări publicate în jurnalele de specialitate. Pentru detalii, trimitem la sinteze recente (de ex.: Lemke, 2001; Garbay & colab., 2000).

5.5 Implicaţiile mielinizării pentru funcţionarea sistemului **nervos**

Funcţia generică a mielinizării este de a creşte viteza de conducere a impulsurilor nervoase. Această modificare funcţională este semnificativă din punct de vedere evolutiv întrucât viteza de conducere a impulsului nervos permite, în principiuj o viteză de procesare mai mare, acesta fiind un avantaj al creierului mamiferelor, în general, şi, dintr-o altă perspectivă, un indicator tot mai des discutat în cadrul testelor de inteligenţă.

Mai mult, mielinizarea este un proces mai ales postnatal care, s-a demonstrat de curând, înregistrează maximul în primii doi ani de viaţă, dar continuă până aproximativ în al treilea deceniu de viaţă. Acest fapt ne poate sugera că dinamica mielinei participă la dezvoltarea şi plasticitatea sa. Ca să luăm numai un exemplu de probă indirectă, tot mai multe studii recente arată că o structură de substanţă albă ce leagă cele două emisfere cerebrale, este vorba de corpul calos, se dezvoltă în timpul vieţii postnatale după un gradient rostro-caudal (fronto-temporo-parietal). Această creştere poate fi corelată cu modificări cognitiv-comportamentale cum ar fi vigilenţa şi capacitatea de planificare, asociate cu dezvoltarea între 3 – 6

ani a circuitelor din corpul calos care leagă lobii frontali sau asocierea spaţială şi limbajul, corelate cu creşterea până la 11 – 15 ani a istmusului calos, care leagă sistemele temporo-parietale (Thompson & colab., 2000; Sowell & colab., 1999). Dezvoltarea şi plasticitatea

substanţei albe implică modularea funcţionării circuitelor interemisferice şi cortico-subcorticale. Mielinizarea progresivă a copului calos corelează, de pildă, cu scăderea timpului de transfer interemisferic (Hagelthorn & colab., 2000). Acest parametru are implicaţii funcţionale întrucât, spre un exemplu, copii sub 6 – 7 ani par să nu poată transfera o deprindere vizuo-motorie învăţată cu o mână (emisferă) la cealaltă mână (emisferă) (Chicoine, Proteau & Lassonde, 2000; pentru o sinteză, vezi: Banich & Brown, 2000). Ideea care vrem să decurgă din aceste exemple este că şi substanţa albă participă la dezvoltarea şi plasticitatea sistemului nervos. Sintetic spus, mielinizarea influenţează activitatea electrică a creierului.

În acest context, vom explora în continuare modalităţile activităţii electrice prin care creierul codează informaţia. Este de notat că, atât timp cât explorăm potenţiale electrice evocate pe care le numim „cognitive" pentru că se modifică odată cu modificarea semnificaţiei cognitive a stimulului care, altfel, rămâne identic din punct de vedere senzorial (pentru detalii, vezi: Halgren, 1992, pp. 204 – 211; Olteanu, Lupu & Miu, 2001, pp. 208 – 210), nu este radical să spunem că orice comportament este elaborat şi codat prin modificări specifice ale activităţii electrice a creierului. Această activitate electrică se poate descompune în diverse tipuri de semnale, care reprezintă semnele care pot forma suficient de multe combinaţii pentru a spune că activitatea electrică este codul în care creierul elaborează cogniţia.

Modul în care creierul elaborează ceea ce numim generic cogniţie şi coordonează comportamentul este conceptualizat tradiţional în două feluri. O primă teorie are la bază activitatea unităţii morfo-funcţionale a sistemului nervos, neuronul. Această teorie presupune că, între neuroni, comunicarea este posibilă prin succesiuni de impulsuri nervoase care, la nivelul sinapselor, sunt transformate în analogul lor chimic. Această din urmă ipoteză dispune de suport experimental întrucât s-a observat că unii neuroni eliberează cuante de neurotransmiţător proporţional cu frecvenţa şi amplitudinea potenţialelor de acţiune (vezi: Ruppersberg & Herlitze, 1996) Mesajele se consideră că sunt codate prin intervalele dintre aceste impulsuri.

O altă teorie a semnalizării neuronale are la bază activitatea electrică a populaţiilor de neuroni. Descărcările neuronilor, ponderate după numeroase reguli (tipul sinapsei, excitator sau inhibitor, istoria descărcărilor unei celule ş.a.), descriu o activitate electrică

reprezentativă pentru populaţii locale. Şi această teorie dispune de suport experimental. S-a arătat, de pildă, că neuronii care formează o hărţi funcţionale ca, de pildă, cele susţinute de coloanele de dominanţă oculară sau benzile de izofrecvenţă, care ştim că respectă reguli de organizare funcţională cum ar fi retinotopia sau tonotopia, conţin neuroni care au descărcări relativ omogene, sugerând că aceştia codează un anumit aspect al experienţei senzoriale. Un indice al acestei activităţi electrice a unei populaţii de neuroni este potenţialul de vârf al

289

populaţiei care este corelat temporal şi ca magnitudine cu descărcările neuronilor „individuali. Ele reflectă numărul de neuroni care descarcă şi sincronicitatea cu care aceştia descarcă (Andersen, Bliss & Skrede, 1973).

Cel mai interesant exemplu este dat de sistemul nervos de la două specii de peşti electrici al căror comportament electrosenzitiv poate fi corelat cu activitatea nervoasă a unor populaţii de neuroni din trunchiul cerebral. Povestea comportamentului acestor peşti este fascinantă. Ei au un organ electric care produce un câmp electric în jurul peştelui. Sistemul lor senzitiv include două tipuri de celule senzitive, tuberoase şi ampulare, care sunt răspândite pe suprafaţa externă a peştelui, de la cap până la coadă. Prin influenţa asupra propriului câmp electric, peştii pot căpăta informaţii despre obiectele învecinate. Axonii care inervează celulele receptoare se termină la nivelul trunchiului cerebral, unde se găseşte o structură numită lobul liniei laterale electrosenzitive. Această structură nervoasă conţine 4 reprezentări somatotopice ale suprafeţei corpului, reprezentare nervoasă care păstrează topologia segmentelor corpului şi a cărei extindere este determinată de densitatea receptorilor din fiecare zonă. Axonii care adună informaţii de la celulele ampulare formează o astfel de reprezentare (hartă), iar cei de la celulele tuberoase formează celelalte trei hărţi. Activitatea electrică a populaţiilor de neuroni din aceste hărţi somatotopice tuberoase poate fi corelată cu comportamentul prin care peştele evită ciocnirea cu alţi conspecifici (pentru detalii, vezi: Young, 1997 şi referinţele). Deci, în acest caz, relaţia dintre modalităţile activităţii electrice neuronale şi comportament este uşor de stabilit.

Activitatea electrică care susţine semnalizarea dintre neuroni

trebuie să ia în considerare nu numai potenţialele de vârf, ci şi alte modificări electrice care se întâmplă într-o populaţie de neuroni. Aceste „semne", deci, componente ale activităţii electrice a creierului, aşa cum le putem înregistra cu mijloacele actuale, includ şapte tipuri cunoscute de modificări electrice (Bullock, 1997).

Primul tip este potenţialul intraceluâar, adică potenţialul înregistrat la nivelul unei singure celule, reprezentativ pentru starea electrică a unui singur compartiment al neuronului, fie corp celular, dendrită, axon, terminal sau sinapsă. Aceste modificări electrice foarte locale la nivelul unei celule au fost sugerate de o teorie propusă de R. Gesell în 1940, care susţinea că există un gradient de repaus între polurile dendritic şi axonai ale neuronului. Alt tip este reprezentat de potenţialele unice de vârf extracelulare care sunt înregistrate la 50 – 100 um de neuronii activi, care descarcă impulsuri. Activitatea electrică multiunitară, alt tip de semn electric, este înregistrată pe un perimetru de 100 – 200 jxm faţă de câţiva neuroni care au activitate rapidă (frecvenţă >1 Hz), cu potenţiale de vârf. S-a înregistrat şi un tip de activitate electrică tot multiunitară, tot rapidă şi cu potenţiale de vârf, dar cu amplitudini atât de mici încât nu se poate estima activitatea câtor neuroni reflectă. Fluctuaţiile rapide (40 – 200 Hz), graduale, fără potenţiale de vârf reflectă potenţiale postsinaptice sau alte evenimente electrice gradate, de la nivelul dendritelor, corpului celular sau terminalului axon ic şi sunt un alt tip de semn electric. Acestea reprezintă o mică parte din modificările care sunt indicate de electroencefalogramă (EEG), faţă de potenţialele lente (O.1 – 40 Hz) care reprezintă

mare parte din spectru! EEG la vertebrate. Ultima categorie de semne electrice cunoscută sunt potenţialele infralente, care sunt determinate de fluctuaţii ale potenţialului de repaus, care sunt mai lungi de 10 s şi care pot dura chiar minute.

Am menţionat toate aceste forme ale activităţii electrice pentru a sublinia două aspecte. În primul rând, este verosimil să presupunem că, cel puţin prin diversitatea acestor semne electrice şi numărul imens de combinaţii pe care le pot susţine la nivelul unei populaţii neuronale, activitatea electrică a neuronilor poate fi codul în care creierul elaborează comportamentul. În al doilea rând, motivul pentru care am optat să plasăm acest paragraf aici este că modificări ale

conductibilităţii neuronilor prin procese cum ar fi mielinizarea determină maturarea semnalizării în sistemul nervos. De aici, am, putea specula prin a spune că aceste procese susţin şi modificări comportamentale asociate dezvoltării. Pe de altă parte, mielinizarea presupune un număr foarte mare de variabile electrice, chimice şi mecanice care o pot influenţa. Fiind un proces postnatal, şi modificările din mediu (de ex., dietă, leziuni nervoase) pot afecta mielinizarea, ceea ce ne permite să susţinem că este probabil ca nu toate creierele să fie mielinizate la fel. Mielinizarea şi diversitatea activităţii electrice sunt două dintre motivele pentru a considera că creierele unor indivizi diferiţi sunt semnificativ diferite.

5.6 Rezumat

Maturarea circuitelor nervoase depinde de izolarea electrică a acestora, astfel încât viteza de conducere a semnalului nervos să crească. Acest proces de dezvoltare se numeşte mielinizare şi se extinde dintr-o perioadă prenatală timpurie pană spre pubertate. Neuronii din sistemele nervoase periferic şi centra! sunt mielinizate de celuie diferite, celulele Schwann şi oligodendrocitele, respectiv. Mielina secretată de aceste celule se diferenţiază de alte membrane celulare prin raportul mare dintre lipide şi proteine. Fazele diferenţierii celulelor secretoare de mielină sunt controlate şi prin expresia limitată spaţio-temporal a unor factori de transcripţie, care semnalizează trecerea de la o fază a mieâinizării la alta. Mielinizarea se bazează pe semnalizarea dintre axon şi celula secretoare de mielină, programul de mielinizare fiind dependent de semnale de la axon, iar axonui suferind unele modificări ultrastructurale ca urmare a contactului cu celula secretoare de mielină. Neurotrofmele sunt principalii agenţi care mediază această dublă semnalizare. Modificarea conductibilităţii odată cu mielinizarea fibrelor nervoase are implicaţii funcţionale asupra proprietăţilor reţelelor neuronale şi, implicit, asupra comportamentului.

29!

REFERINŢE BIBLIOGRAFICE:

— Referinţe recomandate Referinţe de mare interes

Aguayo, A.J., Epps, J., Charron, L., Bray, G.M. (1976) *Multipotentiality of*

Schwann cells în cross-anastomosed and grafted myelinated and unmyelinated nerves: quantitative microscopy and radioautography.

Brain

Res. 104, 1 – 20 Andersen, P., J3 liss, T.V.P., Skrede, K.K. (1971) *Unit analysis of hippocampal population spikes.* Exp. Brain Res. 13, 208 – 221 Anton, E.S., Weskamp, G., Reichardt, L.F., Metthew, W.D. (1994) *Nerve growth factor and its low affinity receptor promote Schwann cell migration.* Porc.

Natl. Acad. Sci. USA 91, 2795 – 2799 Armstrong, R., Harvath, L., Dubois-Dalcq, M.E. (1990) *Type 1 astrocytes and oligodendrocyte-type 2 astrocyte glial progenitors migrate towards distinct molecules.* J. Neurosci. Res. 27, 400 – 407 Back, S.A., Luo, N.L., Borenstein, N.S., Levine, J.M., Volpe, J.J., Kinney, H. C.

(2001) *Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter înjury.* J.

Neurosci 21, 1302 – 1312 Balice-Gordon, R.J., Bône, L.J., Scherer, S.S. (1998) *Funcţional gap junctions in the Schwann cell myelin sheath.* J. Cell. Biol. 142, 1095 – 1104 Banich, M.T., Brown, W.S. (2000) 4 *life-span perspective on interaction between the cerebral hemispheres.* Dev. Neuropsychology 18, 1-10 Barde, Y.A., Edgar, D., Thoenen, H. (1982) *Purification of a new neurotrophic factor from the mammalian brain.* EMBO J. 1, 549 – 553 Barkemeier, L.R., Winslow, J.W., Kaplan, D.R., Nokolics, K., Goeddel, D. V.

Rosenthal, A. (1991) *Neurotrophin-5: Neurotrophic factor that activates*

Trk and trkb. Neuron 7, 857 – 866 Barkovich, A.J., Lyon, G., Evrard, P. (1992) *Formation, maturation, and disorders of white matter.* Am. J. Neuroradiol. 13, 447 – 461 Barkovich, A.J., Kjos, B.O., Jacson Jr., D.E., Norman, D. (1988) *Normal brain maturation of the neonatal and infant brain: MR imaging at 1.5 T.*

Radiology 166, 173 – 180 Barrès, B.A., Schmid, R., Sendnter, M., Raff, M.C. (1993) *Multiple extracellular signals are required for long-term olygodendrocite survival.* Development

118, 283 – 295 Blanchard, A, D., Sinanan, A., Parmantier, E., Zwart, R., Broos, L., Meijer, D.

Meier, C, Jessen, K.R., Mirsky, R. (1996) *Oct-6 (SCIP/Tst-l) is expressed în Schwann cell precursors, embryonic Schwann cells, and postnatal myelinating Schwann cells: comparison with Oct-l, Krox-20, and Pax-3.* J.

Neurosci. Res. 46, 630 – 640
292
Bolin, L.M., Shooter, E.M. (1993) *Neurons regulate Schwann cell genes by diffusible molecules.* J. Cell. Biol. 123, 237 – 243 Brockes, J.P., Raff, M. C, Nishiguchi, D.J., Winter, J. (1980) *Studies on cultured rat Schwann cells. III. Assays for peripheral myelin proteins.* J.
Neurocytol. 9, 67 – 77 Bronner-Fraser, M. (1986). *Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using the monoclonal antibody HNK-1.* Dev.
Biol. 115, 44 – 55 Bullock, T.H. (1997) *Signals and signs in the nervous systern: The dynamic anatomy of electrical activity is probably informaţion-rich.* Porc. Natl.
Acad. Scă. USA 94, 1 – 6 Bunge, R.P., Bunge, M.B., Eldridge, C. F. (1986) *Linkage between axonal ensheatment and basal lamina production by Schwann cells.* Annu. Rev.
Neurosci. 9, 305 – 328 Bunge, R.P., Bunge, M.B., Bates, M. (1989) *Movements of the Schwann cell nucleus implicate progression of the inner (axon-related) Schwann cell process during myelination.* J. Cell. Biol. 109, 273 – 284 Campagnoni, A. (1988) *Molecular biology of myelin proteins from the, centrai nervous sistem.* J. Neurochem. 51, 1-14 Canossa, M., Griesbeck, O., Berninger, B., Campana, G., Kolbeck, R., Thoenen, H.
(1997) *Neurotrophin relea.se of neurotrophins: Implications for activitydependent neuronal plasticity.* Porc. Nat! Acad. Sci. USA 94, 13279
13286 Chan, J.R., Phillips II, L.J., Glaser, M. (1998) *Glucocorticoids and progestins signal the initiation and enhance the arte of myelin formation.* Porc. Natl.
Acad. Sci. USA 95, 10459 – 10464 „Chan, J.R., Cosgaya, J. M, Wu, Y.J., Shooter, E.M. (2001) *Neurotrophins are key mediaţors of the myelination program in the peripheral nervous sistem.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 14661 – 14668
Un studiu excelent în care este demonstrat efectul diferenţiat al unor neurotrofme cum ar fi BDNF şi NT-3 asupra mielinizării. Chernoff, G.F. (1981) *Shiverer: an autosomal recessive mutant mouse with myelin deficiency.* J. Hered. 71, 128 Chicoine, A.-J., Proteau, L., Lassonde, M. (2000) *Absence of interhemispheric transfer of unilateral visuomotor learning in young children and individuals with agenesis of*

the corpus callosum. Dev. Neuropsychology

18, 73 – 94 Choi, B.H., Kim, R.C. (1985) *Expression of glial fibrillary acidic protein by immature oligodendroglia and its implications.* J, Neuroimmunol. 8, 215

235 Clark, P., Connolly, P., Curtis, A.S.G., Dow, J.A. T" Wilkinson, C.D.W. (1990)

Topographical control of cell behavior: II. Multiple grooved substrata.

Deveiopment 108, 635 – 644

293

Cole, J.S., Messing, A., Trojanowski, J.Q., Lee, V. M.-Y. (1994) *Modulation of axon diameter and neurofilamenis by hypomyelinating Schwann cells în* I

transgenic mice. J. Neurosci. 14, 6956 – 6966 Counsell, S.J., Maalouf, E.F., Fletcher, A.M., Duggan, P., Battin, M., Lewis, H.

J., Herlihy, A.H., Edwards, A.D., Bydder, G.M., Rutherford, M. A.

(2002) *MR imaging assessment of myelination in the very preterm brain.*

Am. J. Neuroradiol. 23, 872 – 881 David, S., Aguayo, A.J. (1981) *Axonal elongation into peripheral nervous sistem*

„Bridges" after central nervous sisteminjury în rats. Science 214, 931

933 Destering, N.K., Wells, M.A. (1976) *The non-synchronous synthesis of myelin components during earfy stages of myelination in the rat optic nerve.* J.

Neurochem. 26, 253 – 257 de Waegh, S. M, Lee, V. M.-Y., Brady, S.T. (1992) *Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells.* Cell 68, 451 – 463 Dong, Z., Brennan, A., Liu, N., Yarden, Y., Lefkowitz, G., Mirsky, R., Jessen, K.

R. (1995) *Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors.*

Neuron 15, 585 – 596 Einheber, S., Hannocks, M.J., Metz, C.N., Rifkin, D.B., Saizer, J.L. (1995)

Transforming growth factor-beta 1 regulates axon/Schwann cell interactions. J. Cell. Biol. 129, 443 – 458 Eldridge, C.F., Bunge, M.B., Bunge, R.P. (1989) *Differentiation of axon-related*

Schwann cells in vitro. Part îi control of myelin formation by basal lamina. J. Neurosci. 9, 625 – 638 Emfors, P., Ibáñez, C.F., Ebendal, T., Olson, L., Persson, H. (1990) *Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: Developmental and topographical expression in the brain.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 5454 – 5458 Fannon, A.M., Sherman, D.L., Ilyna-Gragerova, G., Brophy, P.J., Friedrich Jr.

V. L., Colman, D.R. (1995) *Novei E-cadherin-mediated adhesion în peripheral nerve: Schwann cell architecture is stabilized by autotypic adherens junctions.* J. Cell. Biol. 129, 189 – 202 Fern, R., Davis, P., Waxman, S.G., Ransom, B.R. (1998) *Axon conduction and surviavi în CNS white matter during energ) deprivation: A developmental study.* J. Neurophysiol. 79, 95 – 105 Fields, R.D. (1998) *Efects of ion channel activity on developmental DRG neurons.*

J. Neurobiol. 37, 158 – 170 Fitzgerald, M. (1987) *Spontaneous and evoked activity offetalprimary afferents in vivo.* Nature 326, 603 – 607 Fitzgerald, M., Fulton, B. (1992) The physiologicai properties of developing senzory neurons. În: Scott, S.A. (Ed.): *Senzory neurons* (pp. 287 – 306).

Oxford University Press, New York

294

Fraser. S, E., Bronner-Fraser, M. (1991) *Migrating neural crest cells in the trunk of the avian embryo are rrmitipotent,* Deveiopment 112, 913 – 920 Friede, R.L. (1972) *Control of myelin formation by axon caliber (with a model of the control mechanism).* J. Comp. Neuroi. 144, 233 – 252 Friede, R.**L., Samorajski,** T. (1968) *Myelin formation in the sciatic nerve of the rat. A qantâtative electron microscopic, histochemical and radioautographic study.* J. Neuropathol. Exp. Neuroi. 27, 546 – 570 Fujita, S. (1965) *An autoradiographic study on the origin andfate of the subpial glioblasts in the embryonic chick spinal cord.* J. Comp. Neuroi. 124, 51 – 60 Garbay, B., Heape, A.M., Sargueil, F., Cassagne, C. (2000) *Myelin synthesis in the peripheral nervous sistem.* Prog. Neurobiol. 61, 267 – 304 Gard, A.L., Pfeiffer, S.E. (1990) *Two proliferative stages of the oligodenrocyte lineage (*A_2*B5 + 04 – and 04 + Gal-C) under dijferent mitogenic control.*

Neuron 5, 615 – 625 Gilles, F. R, Shankle, W., Dooling, E.C. (1983). Myelinated tracts: growth patterns. În: „Giâles, F.H., Leviton, A., Dooling, E.C. (Eds.): *The developing* ***human*** *brain: Growth and*

epidemiologicai neuropathology (pp.

117 – 183). Wright, Boston Gilmore, S.A. (1971) *Neuroglial populations in the spinal white matter of neonatal and early postnatal rats: an autoradiographic study of numbers of neuroglia and changes in their proliferative activity.* Anat. rec. 171.

283 – 292 Gotow, T., Leterrier, J.F., Ohsawa, Y., Watanabe, T., isahara, K., Shibata, R.

Ikenada, K., Uchiyama, Y. (1999) *Abnormal expression of neurofilament proteins în dysmyelinating axons located în teh central nervous sistem of jimpy mutant mice.* Eur. J. Neur. osci. 11, 3893 – 3903 Hagelthorn, K.M., Brown, W.S., Amano, S., Asarnow, R. (2000) *Normal deveiopment of bilateral field advantage and evoked potenţial interhemispheric transmission time.* Dev. Neuropsychology 18, 11 – 31 Halgren, C. (1992) Emoţional neurophysiology of the amygdala within the context of human cognition. În: Aggleton, J.P. (Ed.): *The Amygdala.*

Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction

(pp. 3 – 66). Wiley-Liss, New York Heape. A., Boiron, F., Cassagne, C. (1987) *A developmental study offatty acyl group contents in the peripheral nervous sistem of normal and trembler mice.* Neurochem. Pathol. 7, 157 – 167 Heape. A.M., Lehto, V.P., Kursula, P. (1998) Demonstration of a direct association between the cytoplasmic domain of the stnall myelin-associated glycoprotein and tubulin. În: *Twenty-Eighth Annual Meeting of the Society for Neuroscience.* Los Angeles Heumann, R., Lindholm, D., Bandtlow; C, Meyer, M., Radeke, M.J., Misko, T.

P., Shooter, E., Thoenen, H. (1987) *Differenţial regulation of MINA*

encoding nerve growth factor and its receptor în rat sciatic nerve during

295

development, degeneration, and regeneration. Porc. Natl. Acad. Sci. USA

84, 8735 – 8739 Jaegle. ML, Mandemakers, W., Broos, L., Zwart, R., Karis, A., Visser, P., Grosveld.

F., Meijer, D. (1996) *The POU factor Oct-6 and Schwann cell differentiation.* Svience273, 507 – 510 Junge, D., Mommaerts, W.F. H.M., Winhorst, LJ. (1996) Senzory transduction and neural coding. În:

Greger, R., Windhorst, U. (Eds.): *Comprehensive*

Human Physiology. Springer-Verlag, Berlin Kajikawa, D., Kubota, H., Mori, T., Shimo-oku, M. (1991) *The distribution of actin on culâured oligodenrocytes from rat optic nerve.* Acta Soc.

Ophtalmol. Jpn. 95, 944 – 950 „Keirstead, H.S., Hasan, S.J., Muir, G.D., Steeves, J.D. (1992) *Supression of the onset of myelination extends the permissive period for the funcţional repair of embryonic spinal cord.* Porc. Nati. Acad. Sci. USA 89, 11664

11668

Experimente care susţin că începerea mielinizării corespunde cu declanşarea perioadei restrictive pentru neuroregenerare în măduva spinării. Roiul inhibitor al mielinei asupra regenerării proiecţiilor dintre trunchiul cerebral şi măduva spinării a fost evaluat prin secţiuni spinale la embrioni de găină menite să întârzie declanşarea mielinizării. Kiernan, B.W., ffrench-Constant, C. (1993) *Oligodendrocyte precursor (O-2A*

progenitor cell) migration: a model sistem for the study of cell migration in the developing central nervous sistem. Development (Suppl.) 105, 219

225 Kinney, H. C, Brody, B.A., Kloman, A.S., Giâles, F.H. (1989) *Sequence of central nervous sistem myelination in human infancy. II. Patterns of myelination in autopsied infants.* J. Neuropathol. Exp. Neurol. 47, 217 – 234 Kitamura, K., Suzuki, M., Uyemura, K. (1976) *Purification and parţial characterization of two glycoproteins în bovine peripheral nerve myelin membrane.* Biochim. Biophys. Acta 455, 806 – 816 Koenig, H.L., Schumacher, M., Ferzaz, B., Do Thi, A., Ressouches, A.

Guennoun, R., Jung-Testas, L, Robei, P., Akwa, Y., Baulieu, E. E. (1995)

Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. Science

268, 1500 – 1503 Le Douarin, N. (1986) *Cell line segregation during peripheral nervous sistem ontogeny.* Science 231, 1515 – 1522 „Lemke, G. (2001) *Glial control of neuronal development.* Annu. Rev. Neurosci.

24, 87 – 105

Unul din cele mai complete şi recente capitole despre relaţia neuron-celulă glială. Levina, N, N., Lew, R.R., Brent Heath, I. (1994) *Cytoskeletal regulation of ion channel distribution in the tip-growing*

organism Saprolegnia ferax. – J.

Cell. Sci. 197, 127 – 134 Levitt, P., Rakic, P. (1980) *Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein în radiat glial cells* ***and*** *astrocytes of the developing rhessus monkey brain.* J. Comp. Neurol. 193, 815 – 840

296

Lim., D.A., Alvarez-Buylia, A. (1999). *Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis.* Porc. Natl. Acad.

Sci. USA, 96 London, Y. (1971) *On peripheral nerve myelin membrane. Purification and parţial characterization oftwo basic proteins.* Biochim. Biophys. Acta 249, 188

196 Manfiletti, G., Ruaro, M.E., Del Sal, G., Philipson, L., Schneider, C. (1990) *A*

growth arrest-specific (gas) gene codesfor a membrane protein. Mol. Cell.

Biol. 10, 2924 – 2930 Martin, J.R., Webster, H.D. (1973) *Mitotic Schwann cells în developing nerve:*

their changes in shape, fine structure, and axon relationships. Dev. Biol.

32, 417 – 431. Martini, R., Mohajeri, M.H., Kasper, S., Giese, K.P., Schachner, M. (1995) *Mice doubly deficient in the genes for PO and myelin basic protein show that both proteins contribuie to the formation of the major dense line în peripheral nerves characteristic of inherited human neuropathies.* J.

Neurosci. 15, 2288 – 4495 McArdle, C.B., Richardson, C.J., Nicholas, D.A., Mirfakhraee, M., Hayden, C.

K., Amparo, E.G. (1987) *Developmental features of the neonatal brain:*

MR imaging: part! gray-white matter differentiation and myelination.

Radiology 162, 223 – 229 Meier, C, MacPike, A.D. (1970) *A neurologica! mutation (msd) of the mouse causing a deficiency of myelin synthesis.* Exp. Brain. Res. 10, 512 – 525 Mirsky, R., Jessen, K. R. (1996) *Schwann cell development, differentiation and myelination.* Curr. Opin. Neurobiol. 6, 89 – 96 Mirsky, R., Winter, J., Abney, E., Pniss, R.M., Gavrilović, J., Raff, M.C. (1980)

Myelin-specific proteins and glycolipids în rat Schwann cells and

oligodendrocytes în culture. J. Cell. Biol. 84, 483 – 494 Morell, P, Norton, W.T. (1980) *Myelin.* Sci. Am. 242, 74 – 89 Murphy, P., Topilko, P., Schneider-Maunoury, Seitanidou, T., Baron-Van

Evercooren, A., Charnay, P. (1996) *The regulation of Krox-20 expressiqn reveals important steps in the control of peripheral glial cell development.*

Development 122, 2847 – 2857 Mukhopadhyay, G., Doherty, P., Walsh, F.S., Crocker, P.R., Filbin, M.T. (1994)

A novei role for myelin-associated gylcoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. Neuron 13, 757 – 767 Nārāyanan, V., Barbosa, E., Reed, R., Tennekoon, G. (1988) *Characterization of a cloned CDNA encoding rabbit myelin P2 protein.* J. Biol. Chem. 263, 8332

8337 Nery, S., Wichterle, H., Fisheâl, G. (2001) *Sonic hedgehog contributes to oligodendrocyte specification in teh mammalian forebrain.* Development

128, 527 – 540

297

80 Noll. E., Miller, R.H. (1993) *Oligodendrocyte precursors originale at the ventral ventricular zone dorsal to the ventral midline region in the mebryonic rat spinal cord.* Development 118, 563 – 573

Cu ajutorul metodei încorporării bromodeoxiuridinei, se confirmă faptul că oligodendrocitele provin dintr-o populaţie de precursori din partea ventrală a măduvei spinării, situaţi dorsal faţă de linia mediană ventrală. Noll, E., Miiler, R.H. (1994) *Regulation of oligodendrocyte differentiation: a role for retinoic acid in the spinal cord.* Development 120, 649 – 660

Măduva spinării embrionară are capacitatea de a elibera cantităţi semnificative de acid retinoic, sugerându-se că acidul retinoic inhibă diferenţierea oligodendrocitelor în timpul dezvoltării embrionare timpurii şi permite astfel dispersarea lor în întreaga măduvă. Norton, W.T., Poduslo, S.E. (1973) *Myelination in the rat brain: method of myelin isolation.* J. Neurochem. 21, 749 – 757 Norton, W.T., Cammer, W. (1984) Isolation and characterization of myeiin. În:

Morell, P. (Ed.): *Myeiin* (pp. 147 – 195). Plenum Press, New York Notterpek, L., Snipes, G.J., Shooter, E.M. (1999) *Temporal expression pattern of peripheral myeiin protein 22 during in vivo and in vitro myelination.* Glia

25, 358 – 369 Olteanu, A., Lupu, V. (2000) *Neurofiziologia*

sistemelor senzitivo-senzoriale. Presa

Universitară Clujeană, Cluj-Napoca Olteanu, A... Lupu, V., Miu, A. (2001) *Neurofiziologia comportamentului uman.*

Presa Universitară Clujeană, Cluj-Napoca Parnavelas, J.G. (2000) *The originandfnigration of corticalneurones: new vistas.*

Trends Neurosci. 23, 126 – 131 Paul, I). L. (1986) *Molecular cloning ofc DNA – for rat liver gap junction protein.* J.

Cell. Biol. 103, 123 – 134 Paul, I). L. (1995) *New functions for gap junctions.* Curr. Opin. Cell. Bioî. 7, 665

672 Peters, A., Palay, S.L., Webster, H. deF. (1990) *The fine structure of the nervosu sistem.* Oxford University Press, New York Pfieffer, S.E., Warrington, A.E., Bansal, R. (1993) *The oligodendrocyte and its manyprocesses.* Trends Cell. Biol. 3, 191 – 197 Phillips, R.J. (1954) *Jimpy, a new totally sex-linked gene in the house mouse.* Z.

Verberbungst. 986, 322 Quarles, R.H., Everly, J.L., Brady, R. O. (1973) *Evidence for the close association of a glycoprotein with myeiin în rat brain.* J. Neurochem. 21.

1177 – 1191 Raff, M.C. (1989) *Glial cell diversification in the optic nerve.* Science 243, 1450

1455 Raff, M. C, Miller, R.H., Noble, M. (1983) *A glialprogenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on the cui ture medium.* Nature 303, 390 – 396

298

he le

a a

Roach. A., Boylan, K., Horvath, S., Prusiner, S.B., Hood, L. E. (1983) *Characterization of clined CDNA reprezenting rat myelin basic protein: absence of expression in brain shiverer mutant mouse.* Cell 34, 799 – 806

Ruppersberg, J.P., Herlitze, S. (1996) Innervation of muscle and neuromuscular transmission. În: Greger, R., Windhorst, U. (Eds.): *Comprehensive Human Physiology.* Springer-Verlag, Berlin

Salzer, J.L., Bunge, R.P., Glaser, L (1980) *Studies of Schwann celiproliferation. III. Evidence for the surface localization of the neurite mitogen.* J. Cel! Biol. 84.767 – 778

„* Sánchez, I., Hassinger, L, Paskevich, P.A., Shine, H.D., Nixon, R.A. (1996) *Oligodendroglia regulate the regional expansion ofaxon caliber and local accumulation of neurofilaments during development*

independently of myelin formation. J. Neurosci. 16, 5095 – 5105

Sunt ilustrate modificări ale ultrastructurii axonului ca urmare a contactului cu oligodendrocitele. Semnale de la oligodendrocite, independente de formarea mielinei, sunt suficiente pentru a induce creşterea radială a axonului în principal prin acumularea locală şi reorganizarea reţelei de neurofilamente.

Schneider-Mounoury, S., Topilko, P., Seitanidou, T., Levi, G., Cohen-Tannoudji, M, Purnin, S., Babinet, C, Charnay, P. (1993) *Disruption of Krox-20 results în alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain.* Cell 75, 1199 – 7214

Sebert M.E., Shooter, E.M. (1993) *Expression ofm RNA – for neurotrophic factors and their factors and their receptors in the rat dorsal root ganglion and sciatic nerve following nerve înjury.* J. Neurosci. Res. 36, 357 – 367

Shaw, G., Weber, K. (1982) *Differenţial expression of neurofilament triplet proteins în brain development.* Nature 298, 276 – 299

Shuman, S., Hardy, M., Pleasure, D. (1983) *Peripheral nervous sistem myelin and Schwann cell glycoproteins: Identification by lectin binding and parţial purification of a peripheral nervous sistem myelin-specific 170.000 molecular mass glycoprotein.* J. Neurochera. 41, 1277 – 1285

„Sidman, R.L., Dickie, M.M., Appel, S.H., (1964) *Mutant mice (quaking and jimpy) with deficient myelination in the central nervous sistem.* Science 144, 309 – 313 Descrierea unor fenotipuri de şoareci la care mielinizarea este defectivă.

Small, R.K., Riddle, P., Noble, M. (1987) *Evidence for migration of oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitor cells in the developing rat optic nerve.* Nature 328, 155 – 157

Sowell, E.R., Thompson, P.M., Holmes, C.J., Jernigan, T.L., Toga, A.W. (1999) *In vivo evidence for postadolescent brain maturation frontal and striatal regions.* Nat. Neurosci. 2, 859 – 861

Spassky, N., Goujet-Zalc, C, Parmantier, E., Olivier, C, Martínez, S., Ivanova, A., Ikenaka, K., Macklin, W., Cerruti, I., Zale, B., Thomas, J, *L, (1998) Multiple restricted origin of oligodendrocytes.* J. Neurosci. 18, 8331 – 8343

Spassky, N., Olivier, C, Perez-Villegas, E., Goujet-Zalc, C,

Martínez, S., Thomas, J.L., Zale, B. (2000) *Single or multiple oligodendroglial lineages: a controversy.* Glia 29, 143 – 148

Stemberger, N.H., Quarles, R.H., Itoyama, Y „Webster, H. deF. (1979) M*yelin-associated glycoprotein demonstrated immunocytochemically în myelin and myelin-forming cells of developing rat.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1510 – 1514

„Stevens, B., Tanner, S., Fields, R.D. (1998) *Control of myelination by specific patterns of neural impulses.* J. Neurosci. 18, 9303 – 9311 Experimente pe culturi celulare în care se arată că frecvenţa descărcărilor neuronilor influenţează expresia moleculei de adeziune îl care mediază mielinizarea.

„Syroid, D.E., Maycox, P.R., Burrola, P.G., Liu, N., Wen, D., Lee K.-F., Lemke, G., Kilpatrick, T.J. (1996) *Cell death in the Schwann cell lineage and its regulation by neuregulin.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 9229 – 9234 Un studiu foarte elegant în care se arată că apoptoza celulelor Schwann joacă un rol important în dezvoltarea nervilor periferici şi că supravieţuirea celulelor Schwann depinde de resurse neurotrofice, în particular de neureguline, care sunt secretate de axonii disponibili pentru a fi mielinizaţi.

Tekki-Kessaris, N., Woodmff, R., Hall. A. C, Gaffield, W, Kimura, S., Stiles, C.D., Rowitch, D.H., Richardson, W.D. (2001) *Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specifleation in the telencephalon.* Development 128, 2545 – 2554

Unul din primele studii în care se arată că progenitorii ologodendrocitelor din telencefal şi din cortex se dezvoltă în partea ventrală a telencefalului sub influenţa SHH.

„Thoenen, H. (1995) *Neurotrophins and neuronalplasticity.* Science 270, 593 – 598 O succintă prezentare a implicării neurotrofinelor în plasticitatea nervoasă.

„Thompson, P.M., Giedd, J.N., Woods-R. P., MacDonald, D., Evans, A. C, Toga, A.W. (2000) *Growth patterns in the developing brain detected by using continuum mechanical tensor mops.* Nature 404, 190 – 192 Un studiu provocator care relaţionează modelul de creştere al corpului calos până în perioada pubertăţii cu dezvoltarea unor capacităţi cognitive.

Timsit, S.G., Bally-Cuif, L., Colman, D.R., Zalc, B. (1992) *DM-20 MINA is expressed during the embryonic development of the nervous systern of the mouse.* J. Neurochem. 58, 1172 – 1175

Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Levi, G., Baron-Van Evercooren, A., Chennoufi, A.B.Y., Seitanidou, T., Babinet, C, Charnay, P. (1994) *Krox-20 controls myelination in theperipheral nervous sistem.* Nature 371, 796 – 799

Una din primele lucrări în care este indicat rolul factorului de transcripţie *Krox-20* în procesul de mielinizare.

Uyemura, K., Yoshimura, K. Suzuki, M., Kitamura, K. (1984) *Lipid binding activities of the P2 protein în peripheral nerve myelin.* Neurochem. Res. 9, 1509 – 1514

300

„Van Buchem, M.A., Steens, S.C.A., Vrooman, H.A., Zwinderman, A, H.

McGowan, J. C, Rassek, M., Engelbrecht, V. (2001) *Global estimafion of myelination in the developing brain on the basis of magnetization transfer imaging: A preliminary study.* Am. J. Neuroradiol. 22, 762 – 766

Un studiu care confirmă debutul foarte timpuriu (< 30 săptămâni gestaţionaie) al mielinizării cu ajutorul metodei imagistice cu transfer de magnetizare. Volpe, J.J. (2000) *Neurology of the newborn.* Saunders, Philadelphia Warf, B. C, Fok-Seang, J., Miiler, R.H. (1991) *Evidence for the ventral origin of oligodendrocytes in the rat spinal cord.* J. Neurosci. 11, 2477 – 2488 „Wehb, A., Clark, P., Skepper, J., Compston, A., Wood, A. (1995) *Guidance of oligodendrocytes and theirprogenitors by substratum totpography.* J. Cell.

Biol. 108, 2747 – 2760

Studiu cu o iconografie de excepţie care demonstrează că oligodendrocitele sunt ghidate în cultură şi în funcţie de topografia substratului. Aceste condiţii ar putea fi extrapolate *in vivo,* dat fiind organizarea paralelă a fibrelor în nervul optic. „Webster, H. deF. (1971) *The geometry of peripheral myelin seaths during their formation andgrowth în rat sciatic nerves.* J. Cell. Biol. 48, 348 – 367

Mult timp s-a considerat că geometria substanţei albe ste cea care împiedică neuroregenerarea în sistemul nervos adult. Un studiu clasic asupra formării straturilor de mielină la nervul sciatic de la şobolan. Wolff, S.D., Balaban, R.S. (1989) *Magnetization transfer contrast (MTC) and tissue waterproton relaxation in vivo.* Magn. Reson. Med. 10, 135 – 144 Wong, E.V., Kenwrick, S., Willems, P., Lemmon, V. (1995) *Mutations in the cell adhesion molecule îl cause mental*

retardation. Trends Neurosci. 18, 168

172 „Wood, P.M., Schachner, M., Bunge, R.P. (1990) *Inhibition of Schwann cell myelination in vitro by antibody to the îl adhesion molecule.* J. Neurosci.

10, 3635 – 3645

Unul din primele studii care au indicat implicarea moleculei de adeziune îl în mielinizare. „Yacovlev, P.I., Lecours, A.R. (1967) The myelogenetic cycles of regional maturation of the brain. În: Minkowski, A. (Ed.): *Regional development of the brain in early life* (pp. 3 – 70). Blackwell, Oxford

Un capitol de referinţă despre programul de mielinizare în creierul uman. Yamada, H., Komiyama, A., Suzuki, K. (1995) *Schwann cell responses toforskolin and cyclic AMP analogues: comparative study ofmouse and rat Schwann cells.* Brain Res. 681, 97 – 104 Yates, A.J., Wherrett, J.R. (1974) *Changes in the sciatic nerve of the rabbit and its tissue constituents during development.* J. Neurochem. 23, 993 – 1003 Young, E.D. (1997) *Paralel processing in the nervous sistem: Evidence from senzory maps.* Porc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 933 – 934 Zhang: J.Y., Luo, X.G., Xian, C.J., Liu, Z.H., Zhou, X.F. (2000) *Endogenous*

BDNF is requiredfor myelination and regeneration of înjured sciatic nerve în rodents. Eur. J. Neurosci. 12, 4171 – 4180

301

Zorick, T.S., Syroid, D.E., Arroyo, E., Scherer, S.S., Lemke, G. (1996) *The transcripţionfactors SCIP and Krox-20 mark distinct stages and cell fates în Schwann cell differentiation.* Mol. Cell. Neurosci. 8, 129 – 146

„Zorick, T. S, Syroid, D.E., Brown, A., Gridley, T., Lemke, G. (1999) *Krox-20 controls SCIP expression, cell cycle exit and susceptibility to apoptosis în developing myelinating Schwann cells.* Development 126, 1397 – 1406 Experimente care susţin rolul unor factori de transcripţie ca SCIP şi *Krox-20* în diferenţierea celulelor Schwann şi mielinizare. Se arată că pierderea expresiei *Krox-20* în celulele Schwann intrate în faza de mielinizare opreşte diferenţierea acestora în stadiul promielinizant şi creşte susceptibilitatea acestora la apoptoză.

302

SUMMARY

NEUROSCIENCES

From Moiecuâar and Cestular Mechanisms to Behavior and

Birth, itself, îs not a particularly important event in the development of the mammalian nervous sistem. Indeed, the neural mechanâsms that underlie many behavioral responses, such as those that support the remarkable degree of motor coordination in precocial mammals, are almost exclusively choreographed prenatally. It follows that behavior is sometimes the best reason to study the embryonai development of the nervous sistem. Moreover, it is beneficiat to assume that the behavior is the mechanism for the evolution of the brain. Together, evolution and development provide the opportunity to study the nervous sistem „în motion", that is, to follow the way in which the nervous sistem leams behavior-to-fit-environment and consequently modifies its organization during development and evolution (Kingsbury & Finlay, 2001). Otherwise stated, the evolution of the nervous sistem has to be viewed as a problem in the evolution of development, an assumption which was first emphasized by W. Garstang who observând that morphological inovations anse anew în ea ch generation. This kind of multidimensional approach to the development of the nervous sistem can prove insightful.

Chapter 1. Neurosciences. A History of the Concepts and the Research Programs Dedicated to the Brain

CHAPTER CONTENTS

1. *The early Progress of Neurosciences Was Driven by Methods*

2. The Neuron Doctrine and Its Three Actors: Ramón y Cajal, Golgi and Mărimisco

3. *The Formation of Neurosciences and the First Research Programs*

4. *The Cognitive Neurosciences and the Funcţional Neuroimagistic Methods*

5. *Genomics, Molecular Neuroembryology and Evolutionary Neurobiology: The Imperial Triad*

In this chapter, we discuss our view on the evolution of modern neurosciences, with a particular emphasis on methodological advances în neuroanatomy, cell and molecular neurobiology, and genomics. Scientists like S. Ramón y Cajal, C. Golgi, and G. Marinesco were three of the pioneers of modern neurosciences, through their contribution to the confirmation of the neuron doctrine. With the development of the funcţional neuroimagistic methods, the

perspectives for the funcţiona! investigation of the human brain have becorae available. We emphasize the implications of the recent deveiopments of these methods. In the final paragraph, we analyse the rather recent and spectacular development of fields like genomics, molecular neuroembryology, and evolutionary neurobiology.

Chapter 2. The Morpfeogenesis and the early Regioiâalization of the Nervous Sistem

CHAPTER CONTENTS

1. *The Axial Organization and the Neural Induction. The Neurulation*

2. The Isthmic Organizer: The Morphogenesis of the Mesencephalon, Rhombencephalon and Cerebellum

3. *The Morphogenesis and regionalization of the Spinal Cord. The early Morphogenesis of the Peripheral Nervous Sistem*

4. *The Morphogenesis of the Prosencephalon*

5. *The Genetic Control of Celular Adhesion: The Molecular-Cellular Interface în Morphogenesis*

The advent of molecular biology to the study of the development of the nervous sistem has produced a growing list of data about gene expressions and functions that cannot be interpretând în a strict morphological paradigm. This has led to a recent paradigmatic change în neuroembriology which can be regarded as a molecular substantiation of the conservatory morphological paradigm (Puelles & Rubinstein, 1995; Puelles, 20012). The molecular data has offered proofs for the early organization of the nervous sistem în longitudinal and transverse (neuromeric) domains. These domains are ussually marked by the expression of one or more genes, such as those that encode transcription factors *(e.g., Hox, Pax, cephalic gap genes)* and signalling molecules *(e.g.,* FGF, TGF-/? SHH) or adhesion molecules *(e.g.,* cadherins). The functions of these gene products are crucial for the development and early regionalization of the nervous sistem, some of them having a key role in the signalling cascades that control certam developmental processes like gastrulation and the neural induction, proliferation, migration, differentiation and adhesion of neuroepithelial celâs. In this chapter, we present the development and early regionalization of the neural plate and neural tube from the

perspective of recent molecular advances. In fact, we debate old problems from neuroembryology with the help of recent molecular data.

1. One of the key findings that settled a conceptual and experimental scaffold for modern embryology was the demonstration of the organizer efect by H.

2 Puelles, L., Rubinstein, J.L.R. (1993) *Trends Neurosci,* 16, 472 – 479; Puelles, L. (2001) *Brain Res. Bull.,* 55, 695 – 710

Spemann. He and his coaaborators showed that gastrulation and neural induction depencl on the signalâing from a posterior structure of the epiblast, localizând at the rostral tip of the primitive streak, which was caâled node (primary organizer). H. Mangold and O. Mangold, and, later, J. Holtfreter, investigated the capacity of diverse tissues, în different stages of differentiation, to respond to an inductive signal from the primary organizer. The y coined the term of neuralization competence of a certain tissue. The study of the interaction and dynamics of the embryonal precursor tissues during gastrulation and neural induction paved the way for a sistemic concept of embryonal development. That is, embryonic tissues should not be regarded as independently growing tissues, but as developing tissues that depend on ea ch other. E. Waddington was one of the first embryologists who studied în chicken embryos the interactiotv between the epiblast and the hypoblast. The major conclusion of her studies was that the hypoblast determines the axial orientation of the epiblast, although more recent experiments have amended these results (see: Khaner, 19953).

These researches have led to the proposal of two models of neural induction. The model of H. Spemann indicated the eexistence of two separate organizers for the head and for the trunk, while the activaţion-transformation model, proposed by P. Niewkoop, considered that neural induction and early specification of the neuroectoderm along the anterior-posterior axis is a two-step process: first, neural induction which is controaled by a neuralizer factor probably derived from the axial mezoderm, and then the specification of the identity of posterior neuroectoderm by a posterior morphogenetic gradient.

The first to show that the signaâs derived from the node were of

a chemical nature was J. Holtfreter who observând that these signals persist even if the node is triturated, boiled, frozen or kept în alcohol. Moreover, these signais can be aparently substituted for by oleic acid or fragments of hepatic or renal tissue. Modern molecular studies have demonstrated that these signals are reprezented* rjy" signalâing molecules which inițiate the expression of specific genes. For example, such a signalâing molecule that can be detected early in the area of the primitive streak is WNT-3 a. This glycoprotein controls the expression of some transcription factors like the *T-hox* transcription factor *T* (Brachyury), which are essential for the formation of axial mezoderm. The neural induction depends also on the repression of certain molecules from the transforming growth factors family, i.e., BMP-4 and BMP-7. At the begining of gastrulation, *BMP-4* is widely expressed on the emire iength of the chicken embryo while *BMP-1* is expressed only în some posterior areas of the embryo. When the primitive streak has formând, the expression of these growth factors becomes limited to a territory at the border between the neural and the non-neural ectoderm, respectively. Molecuies like follistatin, moggin and chordin which are secreted by the axial mezoderm and the ceâls of the organizer have a specific role în repressing anti-neuralizing factors like BMP and activin.

Khaner, O. (1995) *Porc. Natl. Acad Sci. USA,* 92, 10733 – 10737

305

Recent models4 have suggested that neural induction depends on the simultaneous repression of the WNT and TGF-/? pathways. Cerberus is a protein secreted by the anterior ectoderm, which can repress concomitently both WNT and *TGF-jă.* This is one of the reasons în favour of the eexistence of an independent head organizer, postulated by Spemann. This role has been recently claimed by the anterior visceral endoderm, which expresses molecules like Cerberus and *Hex,* a homeobox transcription factor that is able to antagonize chordin and, consequently, promote neural induction through the repression of anti-neuralizing factors. The precordal plate participates in the specification of the anterior neuroectoderm, although its inductive capacity is still debateți (see; Pera & Kessel, 1997 and Foley, Storey & Stern, 19975).

Another efect of the early regionalization of the neural tube is the specification of dorso-ventral identity. This phenomenon has been

most extensively studied in the spinal cord, where norochord grafts placed ectopically in the dorsal part of the spinal cord were able to induce ventral structures such as the floor plate that could not be otherwise specified in the absence of a norochord. A molecule with a key role in the signalling between the norochord and the unspecified neuroectoderm is SHH. This protein can substitute for the presence of the norochord. SHH is secreted by the norochord and its expression can also be detected in the floor plate, after at least 18 hours of celluâar contact between the cells of the norochord and those of the prospective ventral spinal cord. Although the role of SHH is extensively documented, some studiese suggest that the floor plate results from a process of insertion at the ventral midline of a subpopulation of cells from a common progenitor pool called chordoneural hinge that includes both the progenitors of the norochord and those of the floor plate.

We also discuss in this chapter the role of certain transcription factors în neurulation. The expression of *Zic-2* seem to correlate with the tempo of neurulation. The phenotype of mouse *Zic-2* homozygous mutants is associated with the absence of neurulation and the degeneration of the prospective spinal cord, while în heterozygous mutants the neurulation and morphogenesis of the dorsal spinal cord are only delayed.

2. The early regionalization is carried on by secondary organizers, defined as segments of neuroectoderm that have a role in the specification of the identity of the surrounding tissues through diverse molecular signals. There are two identified secondary organizers, that is, the isthmic organizer and the anterior neural ridge. The appearance of the isthmic organizer is preceded by the expression of two transcription factors, *Otx-2* and *Gbx-2,* with restricted domains to the anterior and

Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharya, S., Grunz, H., Bowmeester, T., de Robertis, E.M. (1999) *Mature,* 397, 707 – 710

5 Pera, E. M, Kessel, M. (1997). *Development,* 124, 4153 – 4162; Foley, A. C, Storey, K.G., Stern, C.D. (1997) *Development,* 124, 2983 – 2996

6 Teillet, M.A., Lapointe, F., Le Douarin, N.M. (1998) *Porc. Natl. Acad. Sci. USA,* 95, 11733 – 11738

posterior neuroectoderm, respectively. While initially, în chicken embryos, the territories of expression of the two transcription factors are separated by a neutral segment that expresses neither *Otx-2*, nor *Gbx-2*, until HH 9, the two transcription factors invade a common domain at the junction between the prospective meseneephalon and rhombencephalon, respectively. Although it was thought that the two molecules are antagonistic, their temporary co-expression in this domain proves that there must be a third factor involved în repressing *Otx-2*. This factor has been identified as FGF8 and is considered the key component of the signalling cascade of the isthmic organizer. The territory in which FGF8 is expressed before the repression of *Otx-2* will become the isthmic organizer. Both *Otx-2* and *Gbx-2*

are necessary for the morphogenesis of some neural structures. *Otx-2"* embryos lack completely the anterior neuroectoderm and embryos with a *Gbx-2* ***1*** phenotype lack the anterior rhombencephalon. The morphogenetic influence of the isthmic organizer is supported mainly by two signalling molecules, that is, FGF8 and WNT, that are expressed în two rings of tissue, one more posterior and one more anterior, adiacent to the isthmic constriction.

Recent experiments7 have shown that FGF8 can substitute for the presence of the isthmic tissue. The implantation of FGF8 soaked beads în ectopic locations is associated with the induction of ectopic neural structures, including optic tectum and cerebellum. These and other experiments have proven that FGF8 can induce the expression of genes like *En-*\, *En-2, Wnt-i* and its own expression. But the competence of the neuroectoderm to respond to the isthmic signalling is limited posteriorly at the caudal pole of the rhombencephalon. This lack of competence of posterior neuroectoderm to respond to the isthmic signalling could be due to a posteriorizing signal. Such a signal is retinoic acid (RA) which is known to participate to the induction of genes such as *Shh* and certam *Hox* genes in the neural tube. RA is indeed involved in the morphogenesis of rhombomeres r2-r7 that are distinguished by their specific expression of some *Hox* transcription factors. The fact that RA is a crucial player in the morphogenesis of these rhombomeres is supported by the fact that a single injection of RA is suficient to save the Râdeficient phenotype.

The isthmic organizer is directly involved in the morphogenesis

of the cerebellum. This nervous sistem structure is formed from a region that is called the rhombic lip and is localizând în dorsal îl. We describe the proliferation and migration of various celular populations from the rhombic lip. The cells of the rhombic lip express a wide variety of genes that do not seem to berestricted to the cerebellar derivatives. Therefore, there is no such gene as a marker of the cerebel iar derivatives.

3. In the case of the morphogenesis of the spinal cord, the molecular specificity is more obvious. The neurons of ea ch motor column can be identified through a specific combination of transcription factors whom they express. These

7 Martínez, S., Crossley, P.H., Cobos, I., Rubenstein, J.L.R., Martin, G.R. (1999) *Development,* 126.1189 – 1200

transcription factors are reprezented by members of the LIM family and they seem to establish a LIM code which specifies the chemoaffinity of the migrating cell. As predicted, the perturbation of the LIM code is associated with a modification of the motoneuron's axon trajectory.

Another class of transcription factors that are expressed in the ventral part of the spinal cord are the *Nkx* genes, e.g., Nifoc-2.1, *Nkx-6.2*. A recent model proposed by T. Jessell and collaborators**8** suggest that the celular populations from various vetro-dorsal levels of the spinal cord are specified through the activation of specific combinations of transcription factors by the ventro-dorsal gradient of SHH. According to this model, the transcription factors are categorized în two classes: type 1, transcription factors that are repressed by SHH, such as some *Păx* genes, and type 2, molecules whieh are induced by different levels of SHH, e.g., Mx-2.1 and Mx-6.1.

In the dorsal part of the neural tube, there is a population of cells that forms the neural crests. These cells migrate extensively and differenţiate în numerous types of neural and non-neural cells and they will contribute to the morphogenesis of the peripheral nervous sistem, but they will also differenţiate în pigmentary epithelial cells and craniofacial cartilaje. Although the traditional concept considers that neural crest cells are a separate population of cells that reside in the lateral neural plate and, after the neurulation, in the dorsal neural tube, rather recent researches have indicated that these cells are not a

distinct population in the dorsal neural tube. The dorsal neural tube contains a mixed population of pluripotenţial progenitors that will contribute to the neural crests, the roof plate and they will also differenţiate into comissural neurons. According to the model of Jesseâl and collaborators[8], since the neural crest cells are localizând in the dorsal part of the neural tube, they should be specified at a minimum concentration of SHH as a basic condition. This is pâausible, but the SHH gradient is not suficient for establishing the identity of these cells. Other signals have been identified to contribute to this, most of them, e.g., BMP-4 and BMP-7, the *Zic* protein product, originaling in the superficial ectoderm. For example, the gene *Rho-B* is one of the targets of BMP signalling; the product of this gene can bând to guanozin triphosphate (GTP) and infâuence the process of delamination of the neural crest cells, by its contribution to celâular processes like adhesion, motility, celular cycle ste. Thus, both signals, from the norochord and the superficial ectoderm, participate in the specification of the neural crest cells.

We also discuss the morphogenesis of the neurogenic placodes which are reprezented by smalî thickenings of the superficial ectoderm, in the cephalic region. The neurogenic placodes contribute to the morphogenesis of the senzory cranial ganglios, through the differentiation of their cells both în senzory receptor cells and senzory epithelium. The identity of the placodes is specified by signals

Briscoe, J., Pierani, A, Jessell, T. M, Ericson, J.A. (2000) *Cell,* 101, 435 – 445; see also: McMahon, A.P. (2000) *Genes Dev.,* 14, 2261 – 2264

from the neuroectoderm, as in the case of the ophtalmic placode which is specified by isthmic signalling. and from the non-neural ectoderm, e.g., the epibrachial placodes which are specified by BMP signals.

4. The prosomeric modei has detailed the segmentai domains (prosomeres) of the prosencephalon and has brought the major advances that have contributed to the molecular scientific revolution in neuroembryology and celular neurobiology. The fatemaps studies, corroborated with the analysis of the expression and function of certain genes are the major lines of evidence to support the division of the prosencephalon în six major prosomeres. L. Puelles and collaborators[9] have documented the rather specific expression of

certain transcription factors Hke *Dlx* and *Thr-l* which are expressed and can be used as molecular markers for the subpallial and paliidal domains of the prosencephalon. The secondary organizer that participates to the morphogenesis of the telencephalon is the anterior neura! ridge, with a territory earây marked by the expression of *Dlx-2* and limited at the junction between the rostrai pole of the neural plate and the non-neural ectoderm. Recent studies have confirmed the role of FGF8 as the major component of the signalling cascade that regulates the telencephalic induction. We review the researches that have documented the role of the *Dlx* and *Emx* families of transcription factors members, and MASH 1 in the morphogenesis of the striato-pallidal derivatives of the telencephalon.

5. The cell adhesion is the mechanism of the embryonal morphologic mechanics *(Enwicklungsmechanik"). A* wave of recent evidence has demonstrated the contribution of the HOX and PAX proteins to the regulation of the cell adhesion molecules (CAM). Molecules like the neural cell adhesion molecule (N-CAM), Îl and the neuron-glial cell adhesion molecule (Ng-CAM) have binding domains for HOX and PAX, thus allowing a genetic regulation of the cel! adhesion. We extensively discuss the expression domains of certain cadherins that mark the border of the neuromeres and are able to explain how transcription factors regulate the expression of CAMS and establish the borders of celular growing fields. Molecules like Nand R-cadherin discriminate between numerous nudei, specific regions in the grey matter and even cortical layers and circuits.

Chapter 3. The Specification of the Cortical Areas. The Neurogenesis and Neuronal Migration

CHAPTER CONTENTS

1. *The Neurogenesis, Neuronal Migration and Cortical Development*

2. The Formation of the Funcţional Map of the Cerebral Cortex

Puelles L., Kuwana E., Puelles E., Bulfone A., Shimamura K., Keleher J., Smiga S., Rubenstein J.L.R. (2000) *J Comp Neurol,* 424, 409 – 438 **10** Roux, W. (1895) *Wood's Hole Biol. Lect,* 149 – 190

309

3. *The Neurogenesis in the Adult Brain. The Neuronal Precursors and Celular Therapy*

4. *The Rules of Life and Death: Celular Senescence and Celular*

Death

1. Neurogenesis includes the processes through which the neurons are generated, that is, the proliferative process that allows the formation of the progenitor pool, and the exit of the cells frora the celular cycle (Hollyday, 2001").

We discuss târst the major contributions of W. His and F.C. Sauer to the understanding of the mitotic behavior of the neuroepithelial cells and to the accurate description of the interkinetic nuclear migration of these cells. Kornack and Rakic (1995) **12** and others have shown that the mitotic behavior is one of the keys of the evolution of the isocortex of primates because the duration of the celular cycle of the proliferative cells in the dorsal ventricular zone from the brain of primates is aproximately five times longer than that of the same cells from the brain of rats. The dorsal ventricular region is not the only proliferative matrix to contribute with ceils to the formation of the isocortex. Recent studies**13** have confirmed that a large number of cortical interneurons are generated in the lateral gangiionar eminence (LGE). We follow the formation of the isocortex from the appearance of the preplate unt-i the formation of the six cortical leayers from the cortical plate. We discuss the implications of the postnatal disappearance of the subplate in the mature human brain and its role in the chemoguidance of cortical afferents like the thalamocorticai projections.

Another issue that we detaliate is the role of the marginal zone and of the Cajai-Retzius cells in the neuronal migration and the importance of these cells în explaining the inside-out pattern by which the cortical neurons are generated in the mammaiian brair, We analyse the evolutionary insights offered by a comparison between the deveiopment of the isocortex of mammals and reptiles, respectiveây.

The neuronal migration is an important issue of developmental neurobiology. The radia! migration of neuronal progenitors that travel to the cortical plate has offered a perspective for a parcimonial explanation of the deveiopment and evoiuâion of the isocortex, that is, the radial unit hypothesis. This modei proposed by P. Rakic**14** has been challenged by recent findings which have Indicated that a significant number of cortical neurons migrate în a tangenţial fashion. The eexistence of non-radial migration does not refute the radiai unit hypothesis but caises some questions on the homogeneity of the clonal

relations between neurons from different regions of the isocortex. Elegant studies through real-time microscopy have recently confirmed that the somai translocation, originally described by Berry and Rogers, is another way in which cortical neurons.

11 Hollyday, M. (2001) pe *J. Devt. Neuroscience,* 19, 161 – 173

12 Kornack, D.R., Rakic, P. (1995) *Porc. Natl. Acad. Sci. USA,* 92

13 De Carlos, J. A, Lopez-Mascaraque, L., Valverde, F. (1999) *J. Neurosci.,* 19, 6146 – 6156

14 Rakic, P. (1995) *Porc. Natl Acad. Sci. USA,* 92, 11323 – 11327

310

and most of all, those that are generated early în corticogenesis, are migraţing**13**. We also discuss the knowns and unknowns about the ventricular-guided migration.

One of the most ei egant model sistem for studying the neuronal migration has been reprezented by the cerebellum. We describe the morphological changes and the rather specific modifications of the migration dynamic of the granular cells which travel from the eexternai granular layer towards the profound regions of the internai granular layer of the cerebellar cortex. We analyse the role of the calcium influx and the activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in the migraţiona! behavior of the cerebellar granuâar cells, and also the subcellular modifications that accompany the migration of the cell. Studies that have correlated the polarity of the microtubules with the velocity and direction of migration of a neuron have indicated that the microtubules in the leading process reprezint an important ultrastructural support for the extraordinary plasticity of the migrating cell.

Another perspective upon neuronal migration is offered by the diseases in which this developmentai process is specifically altered. In this case, an învăluable research tooi has proved to be reprezented by the phenotypes with mutations that affect neuronal migration, e.g., REELIN and SCRAMBLER, and, more recently, transgenic mice. We emphasize the role of some molecules în neuronal migration, a role which has been revealed in these studies.

2. The formation of the funcţionai cortical map is controlled „by both genetic and epigenetic factors. Molecular studies have indicated the specific expression of certain molecules and their funcţional role in the specification of certain funcţional cortical areas. Molecules like

LAMP, latexin, the product of the *Otx-2, TBr-l, Fgf-l, Lhx-2*, *Emx-l* genes can discriminate between funcţional areas or layers of the isocortex. Even small fields like those in the hippocampus proper and the ventricular and subventricular zones can be differenţiated by the expression of transcription factors like SCIP and KA1, and *Otx-l* and *Svetl,* respectively. The role of the thalamocortical afferents is aâso discussed in the context of a comparison between the timetables of the morphogenesis of the thalamus and isocortex, respectively. The thalamic afferents have a crucial role in the formation of the funcţional cortical map, a fact wonderfulây demonstrated by experiments in which the retinal afferents have been redirected towards atypical cortical targets, e.g., the auditory cortex. The cross-modal plasticity paradigm has offered a major line oi argument în favour of the role of the thalamocortical projections in the specification of funcţional cortical areas. Moreover, the fact that the redirectioning of inputs from a certain senzory modality carried by thalamic afferents, without altering the. thaâamocortical projections *per se* can determine the funcţional reorganization of the cross-modal cortical target after a pattern corresponding to the thalamic imput modality has confirmed the early funcţional equivalence of

cortical areas. Recent studies**16** have emphasized the extraordinary structural and neurophysiological plasticity of cortical areas early în developraent.

A valuable lesson that can inform the study of the neurogenesis and neuronal migration is the neurogenesis from the adult brain. J. Altman and G. Das were the first to show that new neurons are produced in the adult brain of rodents. After its confirmation in many species and areas in the brain, adult neurogenesis is nowadays among the most exciting and fastest moving areas of neuroscience**17**. We review the core of research that has offered an intriguing issue for the neurophysiologists, most of aii. We describe the tangenţial migration of neurons from the subventricular zone that border the lateral ventricles to the olfactory bulb, following a pathway called rostral migratory stream (RMS). Recent experiments have shown that there are multiple such pathways of tangenţial migration in the adult brain,

e.g., the temporal migratory stream (TMS) 18.

3. Since these studies stand for the eexistence of a population of pluripotentia! progenitors in the adult brain, we discuss the properties of neuronal progenitors. This has also brought us the opportunity to discuss the molecular transformations that are associated with the differentiation of neurons. We extend the discussion of the structural plasticity of the adult brain with a presentation of its implication for the cel la iar therapy.

4. In the final paragraph, we analyse the morphoiogical and molecular modifications that are associated with apoptosis, starting with the experiments of neurotrophic deprivation performând by V. Hamburger and R. Levi-Montalcini to the detaliation of the specific roles of the factors from the *Bel-2* family, the caspase proapoptotic famiây and of the apoptotic activator *Apar-l.* We operationally define the celular senescence from the perspective of the telomere shortening theory.

Chapter 4. The Synaptogenesis. The Formation of Neural Networks and Circuits

CHAPTER CONTENTS

1. *The Synaptic Density în Various Cortical Sistems. Some Morphoiogical Differences between the Synapses*

2. The Active Selection of Synapses

3. *The Development and Assembly of the Synapse*

4. *The Gap-Junctions and the Spontaneous Electricul Activity*

5. The Molecular Mechanisms of the Development and Formation of the Synapse

6. *From Behavior to Synapse and Genome*

16 Kahn, D.M., Krubitzer, L. (2002) *Porc. Natl. Acad. Sci. USA, 99,* în press

17 Rakic, P. (2002) *J. Neurosci.*, 22, 614 – 618

18 Bernier, P.J., Bedard, A „Virtet, J., Levesque, M., Parent, A. (2002) *Porc. Natl. Acad.*

Sci. USA, 99, 11464 – 11469

312

1. The confirmation* of the neuron doctrine by Cajal, and then, the ultrastructural description of the synapse and the elucidation of the quantal mechanism of synaptic transmission, have profiled the synapse as the key component for the neuronal signalling.

One of the early ideas about the development of the nervous sistem postulated that there is a maturational gradient according to which the primary senzory areas of the isocortex maturate firsts, and are being followed by the primary motor areas and the association areas. Synaptogenesis is one aspect of this maturational process. More recent studies using electron microscopy of serial sections have estimated that the density of the synapses în various areas of the isocortex, e.g., the primary visual cortex, the somatosensory cortex, the prefrontal cortex, is largely similar. Moreover, the evolution of the synaptogenesis follows the same pattern, that is, after a period of synaptic redundancy, there is a period of plăteau and a variable period of synaptic selection. The receptor production is synchronized with the timetable of the synaptogenesis, though this is not the case of all receptors, one exception being the NMDA receptor.

We discuss the funcţional relevance and the developmental specificity of some morphological characteristics of the synapses, such as the postsynaptic locus (symetric *vs* asymetric synapses), the synaptic curvature, the size of the synaptic components, the presence of synaptic perforations.

2. One of the basic problems that are associated with synaptogenesis have concerned the factors that instruct the highly specific synaptic connectivity. We review the eexistent theories and experimentai data on this issue, starting with the earây mechanistic theories of P. Weiss to the elegant theory of chemoaffinity proposed by Sperry and its recent molecular support.

3. Synaptogenesis is, first of all, a process of growing. The highly motile growing cone contacts a specific postsynaptic target. The trajectory adopted by the growing neuroblast that will become the presynaptic component is determined by contact, celî adhesion, chemical (e.g., neurotrophic factors) and electrica! factor? (e.g., extraceliular electrical fields). The postsynaptic target is, the most often in the central nervous sistem, a dendritic spine. This microstructure has a highly adaptec cytoskeleton, composed primarily of microfilaments with a rapid reorganizationa; dynamic (see: Kaech et al., 200119). The dynamics of the dendritic arbor can be correlated with the synaptic activity mediated initially by the NMDA receptors, and subsequently by the AMPA receptors. The formation of the synapse per *se* requires both trophic and contact conditions, a very

useful experimental sistem for the study of these factors being. the intersomatic synapse between two neurons juxtaposed în culture (see: Haydon, 1988**20**).

4. A growing list of experiments have confirmed the role of the prenatal spontaneous electrical activity which starts before the maturation of afferents.

19 Kaech, S., Parmar, H., Roelandse, ML, Bommann, C, Matus, A. (2001) *Porc. Natl. Acad. Sci. USA,* 98, 7086 – 7092

20 Haydon, P.G. (1988) *J. Neurosci.,* 8, 1032 – 1038

313

These regular electrical discharges synchronize in the form of waves of spontaneous electrical activity that can be recorded in the retina, and as well in the developing isocortex. This spontaneous activity of the neurons requires the eexistence of gap junctions, that have been observând both in the retina and in structures like the inferior olive or hippocampus. Initially, the neurepithelial cells are connected through gap junctions, but, when the cells exit the celular cycle, they lose these connections. While ştill migrating, the neurons make gap junctions with the radial glial cells, and the pyramidal neurons in the profound and superficial layers of the isocortex are coupled through gap junctions. These junctions have been considered to have a role in the development of neuronal circuitry; one possibility is that the cells coupled through gap junctions are able to reach the same phenotype through intercellular signalling.

5. A major class of molecules that is crucial for synaptogenesis is reprezented by the cell adhesion molecules. Blocking the expression of such a molecule, e.g., N-cadherin, prevents the fasciculation and grouping of the retinal ganglionic projections. Moreover, cadherins participate in the stabilization of the synapse by increasing the contact surface between the presynaptic and the postsynaptic components. During the stages of growth and synaptogenesis, neurons secrete gangliosides, glycosfingolip**ide**, that seem to be associated with the axonal differentiation, but not with the growth of dendrites. The synapsins are a family of proteins with a significant role în synaptogenesis, possibly through a mechanism that involves the reorganization of the actin cytoscheleton, since alt three types of synpasins have binding domains for actin. Another class of proteins that participate to synaptogenesis is reprezented by the

synaptotagmins. Various molecular mechanism that support the development and maturation of the synapses have been discovered în *Drosophila.* This is the case of the product of two genes, that of glutamate decaboxylase (GAD) and a gene called *latheo (lat)* which has proved to encode a subunit of the origin replication complex (ORE). Mutagenesis screenings performând at *Drosophila* have indicated *that lat* plays a specific role în synaptic plasticity.

6. An extension of our presentation about the synaptogenesis concems the signalling between the synapse and the nucleus of the neuron. That is, the expression of certain genes is influenced by the synaptic activity and contributes itself to the synaptic plasticity and the stabilization of a synaptic modification. This is the case of *lat* which is involved both în facilitating the neuronal proliferation and participates alşo to the DNA replication and the regulation of transcription. The most extensively studied form of synaptic plasticity is **long-term** potentiation (LTP), We emphasize the fact that activity-depsudent modifications of the intracellular calcium ievel influence gene transcription, due to a relationship between the transduction of the calcium-dependent signal and certam transcription factors. Such a iranscrâption factor is the CAMP response binding element (CREB) which is **specifically** activated by a complex between the eatafytic subunit of proteân-kinasis A and MAP-kinasis; this complex is forming when a cascade of

molecular events triggered by the synaptic activity determines an increased level of intracellular calcium.

Chapter 5. The **Myelination and Maturation of the Nervous Circuits**

CHAPTER CONTENTS

1. *The Differenţial Myelination of the Central and Peripheral Nervous Sistem* 2" *The Organization and Structure of Myelin*

3. *The Origin, Differentiation and Migration of Myelin-Secreting cells*

4. *Factors that Directly Influence Myelination*

5. *The Implications of Myelination for the Function of the Nervous Sistem*! The study of myelination of the human nervous sistem *in vivo* has been possible through the application of methods like magnetic resonance imaging and magnetization transfer imaging. These studies

have indicated that, at birth, a large part of the brain is unmyelinated and that the peak of myelination is observând in the first two postnatal years. At the human fetus, the myelination begins early in the prenatal life, before 30 gestational weeks. The myelination progresses sistematically: the first to be myelinated (< 20 gestational weeks) are the motor and then the senzory roots of the fibers from the peripherai nervous sistem. In the central nervous sistem, the myelination begins in the spinal cord and progresses rostraliy, the senzory fibers being myelinated before the motor ones. Studâes on the optic nerve have investigated the evolution of the tolerance of myelinated fibers to energy deprivation. These experiments have revealed that there is a temporary dependence on energetic resources, e.g., astrocytic glycogen, aminoacids, phospholipids, that require aerobic conditions. Thus, the nervous fibers are vulnerable to hypoxia in the late phases of myelination. We give a perspective on the evolution of the concept of myelination in the central and peripheral nervous sistem.

2. We discuss the differenţial organization of myelin in the central nervous sistem (CNS) compared with that from the peripheral nervous sistem (PNS). One can discriminate the myelin sheath from other membranes by its high ratio of lipids. to proteins. We give a brief description (e.g., funcţional role, molecular weight, the localization of the molecule in the structure of the myelin sheath, localization on the chromosome, if known) of the most important molecules that form the structure of myelin.

3. Oligodendrocytes originale în a population of precursors situated in the ventra! part, dorsal to the ventral midâine, all along the neuraxis, from the spinal cord to. the telencephaion. It was expected and it has been recently confirmed**21** that

21 Nery, S, Wichterle, H., Fishell, G. (2001) *Development,* 128, 527 – 540; Tekki-Kessaris, N., Woodruff, R „Hall. A. C, Gaffield, W., Kimura, S., Stiles, C.D., Rowitch, D. EL, Richardson, W. D, (2001) De*velopment, 12*8, 2545 – 2554

the differentiation of oligodendrocytes is dependent on the hedgehog signalling. At least two transcription factors are associated with specific stages of oligodendrocyte differentiation, that is, *Krox-20* and SCIP. The expression of SCIP is initially important for the entry of the oligodendroeyte progenitors in the promyelinating stage, while its

repression, concomitent with the activation of *Krox-20* is essential for the exit of the cells from this stage and their progression to the next stage of differentiation. The retinoic acid is an important regulator of oligodendrocyte differentiation and its possible role is to protect the progenitor pool that will give râse to oligodendrocytes from FGF8 until the expression of this morphogen is limited în discrete regions of the nervous sistem. We analyse the relationship between the myelination and the correlated modifications in the ultrastructure of the axon, e.g., the phosphorilation of neurofilaments. We also give a briei description of the major phenotypes that are associated with defects of myelination, that is, *shivererjimpy* and *quaking.*

4. Recent studies22 have reported that the spontaneous electric discharges of neurons *in utero* are crucial for the adhesion and proper myelination. Low frequency discharges inhibit the expression of cell adhesion molecules Hke LI, while higher frequencies allow the expression of îl and the adhesion between the myelin-secreting cell and the axon. Certam neurotrophins are crucial for. myelination. For example, NT-3 has an inhibitory role in the promyelinating stage, so, its level must be decreased until the induction of myeâination. Brainderived neurotrophic factor (BDNF) signal is necessary at the begining and during the myelinating stage. We emphasize that myelination is based on the reciprocal signalling between the axon and the myelin-secreting cell.

5. In the final paragraph, we analyse the behavioral implications that are associated with myelination and the contribution of the white substance to the plasticity of the developing and adult nervous sistem. The development and the plasticity of the white substance implies the modulation of the functioning of the interhemispheric and cortico-subcortical circuits. For example, the myelination of the corpus callosum correlates with the interhemispheric transfer time.

Stevens, B, Tanner, S., Fields, R.D. (1998) *J. Neurose L,* 18, 9303 – 9311

INDEX DE TERMENI

Acetilcolină, 6
Acid osmic, 4
Activină, 48
ADN, 2, 29, 30, 32, 33, 88

Aminoacizi, 5
ANR (creastă neurală anterioară), 58.
81 – 84
Antagonism molecular, 43
Apoptoză, 170, 173, 174, 175, 176.
200, 202, 272, 273, 295
AR (acid retinoic), 99
AVE (endoderm visceral anterior).
46 – 49
Axoplasmatic, 5
— Transport axoplasmatic anterograd, 5
— Transport axoplasmatic retrograd, 5
3
Blastomer, 37, 39, 40
BMP *(bone morphogenetic protein)*
— BMP-4, 43, 44, 45, 48, 63, 77, *95*
— BMP-7, 43, 63
BOLD (semnal), 15
Butoni terminali, 5
Buză rombică, 70 – 72
Căderine, 89 – 91, 104, 105, 108, 230.
231, 255
Carmin (colorare cu), 4
Celule
— Cajal-Retzius, 119, 120, 131, 180
— Gliale radiale, 122, 125
— Neuroepiteliale, 116
— Schwann, 261, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 278, 279, 280, 281, 293, 295
— Suşe embrionare, **16**5, 166, 172
— Suşe neuronale, 150, 151, 153, 160, 163, 164, 172
Celular
— Adeziune, 77**, 86 – 9**1, 109, 111.
— Câmp de creştere Cerberus, 45, 47, 48, 49. Chemoafinitate (teoria), 216, 217, 230
Circulaţie cerebrală, 15 Citoarhitectură, 10 Cognitiv
— Abordare, 14 Cogniţie, 1 Comportament, 1, 2 Comportamental

— Flexibilitate, 27
Con de creştere, 216, 217, 219, 220.
222
Cordină, 43 – 45, 48, 50, 109
Corpi tigroizi, 5
Corpuscufii Nissi, 10
Creier, 1, 2
— Evoluţie, 27 – 28
— Explorare funcţională, 15 Creste neurale, 75
— Delaminare, 77, 88, 101
B
Degenerare, 4
— Anterogradă (walleriană), 4
Dendrite, 9
Depolarizare, 6
Diferenţiere, 115, 130, 132, 136, 147.
148, 149, 150, 151, 152, 153, 154.
155, 156, 157, 158, 159, 160, 161.
163, 165, 167, 174, 165, 190, 262.
Hi.
317
264, 269, 270, 271, 273, 276, 280.
281, 291, 295
Dlx, 80, 82, 84 – 86
Drosophila, 28, 29, 31, 32, 33, 42.
45, 49, 54, 59, 60, 74, 84, 93
E
Ectoderm, 36 – 58
Endoderm, 36 – 58
— Visceral anterior
Epiblast, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 43.
46, 48, 49, 50, 62, 97, 100
Electrod de petic, 7
Electrofiziologic, 14
Evoluţie, 52, 105, 113, 114, 118, 121.
126, 127, 179, 180, 200
Excitator (influenţă), 5
Factori de transcripţie, 30, 47, 49, 75.

82, 85
FGF *(fibroblastic growth factor)*, 30.
53, 59.61, 62 – 66, 82, 84, 92, 95, 98.
99, 107
Folistatină, 43, 44, 48
Gastrulaţie, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 54, 64 Gbx-2 (factor de transcripţie), 59, 64, 65, 71, 72, 98, 102 Gene 234, 241
— Duplicare, 19 – ortoloage, 18, 29
— Redundanţă, 29 Genom, 28, 29 – secvenţiere, 17 Genomică, 17 Glucoza
— Consum cerebral, 15 Glutamat, 15
H
Hartă funcţională, 113, 114, 134
Hex (factor de transcripţie), 47, 48.
49, 50
Himerism
— Prepeliţă-găină, 81, 84, 52
Hipoblast, 37, 38, 39, 97, 100
Hipocamp, 10
HOX (factor de transcripţie), 29, 30.
31 – 32, 47, 68, 69, 70, 71, 72, 87, 88.
89, 90, 92, 99
Individ, 2
Inducţia neurală, 30, 34, 36, 41, 42.
44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 53, 58.
68, 76, 92, 97, 100, 106, 109
Inhibitor (influenţă), 5
Interdisciplinar
— Cercetare, 13
— Domeniu, 13 Ionic
— Canal, 6
— Curent, 6 Ipoteza
— Ionică, 6
— Unităţii radiale, 125
Istoria concepţiilor despre creier,!
26
Izocortex, 113, 114, 118, 119, 120.

122, 126, 127, 131, 132, 333, 136.
138, 139, 140, 141, 161, 169, 170.
172, 175, 177, 186, 188, 198, 200.
203
Joncţiune de tranzit (gap), **22**7, 228, 229, 242, 255
318
Legea polarizării dinamice, 9
Lezare, 4
LTP, 212, 231, 236, 237, 240
M
Marker, 5
— Molecular, 34, 47, 63, 72, 73, 92, 92, 109
— Radioactiv, 5
Măduva spinării, 32, 41, 58, 60, 67.
81, 88, 107
Mediu nonstaţionar, 27
Meninge, 3
Metabolism cerebral, 15
Metode, 3 – 7
— Etichetare, **3 – 7**
— Etichetare anterogradă, 5
— Etichetare retrogradă, 5
— Metoda Golgi, 3, 4, 7 – 11
— Metoda Nisst, 10
Mezencefal, 35, 49, 52, 53, 55, 58, 59, 60.61, 64, 65, 67, 70, 72, 73, 75, 77, 89, 92, 106 Mezoderm, 36 – 58 Microscop, 3
— Tehnici auxiliare, **3 – 7** Microlubuli, 116, 129, 130, 132, 159, 160, 200, 268, 277
Mielină, 4, 260, 261, 262, 264, 265.
266, 267, 268, 269, 271, 272, 274.
275, 277, 278, 279, 280, 284, 294
Mielinizare, 260, 26**1, 26**2, 263, 264.
268, 269, 272, 273, 274, 275, 276.
277, 278, 279, 280, 281, 282, 284.
293, 294, 295
Migrare interkinetică, 116, 122, 180
Migrare radială, **128**
Migrare tangenţială, 157, 161

Minte, 1
Mitoză, 116, 117, 118, 174, 178, 179.
197
Molecule.
— De semnalizare, 29 Molecular
— Cascade, 29
Morfogeneză, 28, 29, 31, 32, 33, 42, 49, 50, 51, 53, 54, 58, 61, 65, 67, 68, 69, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 81, 82, 84, 85, 87, 91, 92, 97, 102, 104, 107 Mutageneza
— Monitorizare (screening), 17, 29 Mutaţie, 31, 32, 43, 55, 89 Motoneuroni, 53, 54, 55, 71, 74, 75, 98
N
Nervos
— Fibră nervoasă, 4
— Reţea nervoasă difuză, 7 Neurobiologie evoluţionistă, 17 – 19 Neuroectoderm, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 72, 75, 77, 78, 81, 84, 95, 102, 104, 106, 111 Neuroembriologie, 29, 78, 79, 86, 92
— Moleculară, **17 – 19**, 86
— Morfologică, 18
Neurogeneză, **11**5, 117, 133, 134, 146, 151, 160, 161, 162, 163, 164, 172, 175, 177, 181, 182, 197, 205
— Adultă, **143**
Neuromer, 31, 35, 53, 58, 78, 87, 90.
91 Neuron, 2, 8
— Teoria (doctrina) neuronului, **3, 7 – 11**
— Teoria reţelei nervoase difuze (reticulară), 7 – 11
— Unitate morofologică, funcţională, 4 Neuronal
— Activitate neuronală, 14 – 17
— Organite neuronale, 5
— Proces neuronal, 4
— Reţea neuronală, 4
reţea neuronală artificială (neuromimetice), 16
319
Neuroregenerare, 163, **168** Neurotrtiinţe, **1, 1 – 26**
— Cognitive, **14 – 17**
— Societate de 14 Neurotransmiţător, 5 Neurotrofme, 279, 280, 284, 286, 293
Nkx (factor de transcripţie), 75

NMDA (receptori), 124
Nod, 36, 38, 40, 41, 42, 44, 45, 46.
50, 51, 57, 63
Nodal, 47, 48, 55
Noghină, 43
Norocord, 36, 40 41, 42, 44, 45, 46.
49, 50.51, 54, 55, 56, 57, 75, 76, 77.
94, 104
O
Oligodendrocite, 276, 277, 278, 280.
284, 291, 292, 294
Organizator
— Istmic, 58
— Primar, 34, 36, 53 – secundar, 63, 65, 82, 83… Glx-2, 32, 49, 59, 61, 64, 67, 68, 71, 72, 84, 98, 102, 106
Oxigen
— Consum cerebral, 15
P
Paradigmă, 12
— Columnară, 35…
— Moleculară, 35 – 36
— Plasticităţii transmodale, **14**1, 187, 203
PAX (factor de transcripţie), 29, 30.
31 – 33, 59, 61, 67, 72, 75, 80, 87, 88.
89, 90, 91, 92, 99, 109
Peroxidaza de hrean, 5
Placa corticală, **11**9, 120, 122, 128.
131, 140, 180
Placa neurală, 35, 38, 40, 43, 44, 45.
50, 53, 57, 76, 84, 97
Placa podelei, 38, 53, 54, 55, 57, 71
Placa precordală, 38, 40, 41, 42, 46.
48, 49, 50, 51, 53, 55, 97, 100, 104
Placa tavanului, 38, 57, 71, 72, 76
Placode neurogenice, **76 – 77**
Pluripotenţial, 144, 161, 163, 164.
190
Postsinaptic

— Densitate, 209, 233 Potenţial
— De acţiune, 5
— De câmp locale, 16
— De repaus, 5 Precocial, 28 Preplacă, **119**
Prozencefal, 34, 35, 49, 51, 52, 55, 58, 59, 61, 63, 64, 65, 78, 79, 80, 81, 83, 84, 86, 91, 92, 95, 106, 107, 108 Prozomer, 35, 65, 66, 72, 78, 79, 80, 81, 84, 86, 105
R
Reacţia neagră, 3
REELER, 131 – 132, 204 Reelin, 131 – 132
Regionalizare, 28, 31, 34, 35, 41, 51, 52, 58, 63, 64, 67, 68, 70, 73, 85, 86, 90, 92, 93, 98, 106, 107 Reprezentare internă, 14 Retinotopie, 138 –.; – Reţea migratorie
— RMS (reţea migratorie rostrală), 157, 159.
— TMS (reţea migratorie temporală), 161
Revoluţie ştiinţifică, 12 Ribozomi, 5
Rombencefal, 32, 35, 49, 53, 58, 59, 60, 61, 67, 68, 69, 70, 72, 73, 74, 90, 92, 97
320
Rombomer, 35, 53, 58, 59, 61, 64, 69, 70, 71, 99
SCRAMBLER, **131**
Selecţia sinapselor, 207 Semnalizare
— Electrică, 2
— Sinapsă-nucleu, 23**5, 24**1, 242 Senescenţă celulară, 178, 179
SHH (moleculă de semnalizare), 30, 48, 52.54, 55, 56, 57, 63, 67, 74, 75, 77, 95, 102, 109 Sinapsă, 3, 5 – 7, 10, 205, 20**7, 209.**
212, 214, 216, 219, 223, 225, 227, 228, 230, 231, 233, 235, 237, 239, 251, 252
— Neuromusculară, 5
— Electrică, 6 Sinaptic
— Comunicare sinaptică, 5
— Densitate sinaptică, 206, 207, 208, 210, 212, 213, 223
— Integrare sinaptică, 4 – 5
— Mecanism de transmitere, 3
— Plasticitate, 207, 225, 234, 235, 236, 241, 242, 252
— Terminaţie sinaptică, 5 Sinaptogeneză, 205, 207, 209, 211.
213, 223, 224, 227, 230, 232, 233, 234, 235, 245, 255, 258
Sistem nervos morfogeneză şi regionalizare timpurie, 27 – 90

Somatotopie, 138 Specie, 2
Şanţ primitiv, 36, 45, 62
Talamorcortical (proiecţii), 120, 134, 135, 136, 138, 139, 140, 141, 142, 180, 187, 198, 203 Telencefal, 65, 79, 81, 82 – 84, 95 T-ŢI (factor de creştere), 30, 43, 45, 47, 49, 55, 77, 92 Telomer, 165, 178, 179, 180 Tomografie
— Cu emisie de pozitroni (PET), 15
— Cu rezonanţă magnetică funcţională, 15 – 17
— Substrat neurofiziologic, 16 – 17 Tonotopie, 138
Tub neural, 41, 42, 43
V
Validitate ecologică, 16
Vitamina A, 67, 68, 97
Voltaj clamă *(voltage clamp)*, 6
W
Wnt-3 a (moleculă de semnalizare), 42, 43
Z
Zonă
— Activă, 223
— Marginală, 119, 120, 131
— Intermediară, 119, 126, 173
— Subventriculară, 136, 146, 147, 150, 152, 156, 158, 160, 163, 170, 171, 188, 193
— Ventriculară, 115, 116, 118, 119, 120, 122, 125, 126, 127, 130, 132, 133, 134, 136, 146, 150, 153, 154, 159, 174, 180, 204
321
Str. Ospătăriei nr. 4, 3400 Cluj-Napoca, România tel. / fax 402 64 429675, email: chibulcaitiivahooconi www.eciituradacia.ro
Tiparul executat prin comanda nr. 397, 2002, la **CARTPRINT** Baia Mare, cod 4800. cartier Săsar, str. Victoriei nr. 291 tel. /fax: 062/218923 ROMÂNIA
Colecţia UNIVERSITARIA

Nr. crt.	Autor ***Titlu***	Nr. de pagini	Preţ	de ex e co

				e
1.	Vaafev. Micu & e o ***Word perfect***	168	10.000	
2.	Viorel Handra Luca & co ***Robotii***	268	15.000	
3.	Raii Rţa & ceHxiaerii ***Tehnologia construcţiilor***	356	30.000	
4.	V. Marcu ***Analiza sistemelor mecanice***	246	30.000	
5.	Gh. Văsaru ***Geocronologie nucleară***	352	40.000	
6.	Virgi! Iga ***Organizarea forţei de muncă în industria minieră***	284	60.000	
7.	G. Niac, H. Născu ***Chimie ecologică***	208	25.000	
8.	Simion Gocan ***Cromatografia de înaltă performanţă***	188	40.000	
9.	Ileana Galea ***Victorianism and literature (lb. engleză)***	247	70.000	
10.	R. Neacşu, A. Ciocănea ***Calculul, proiectarea şi încercarea pompelor, ventilatoarelor, suflantelor şi compresoarelor***	424	83.000	
11.	Ossi Horovitz, Costel Sârbii, Horia F. Pop ***Clasificarea raţională a elementelor chimice***	260	85.000	
12.	Tatiana Dănescu ***Conturile anuale***	264	60.000	
13.	Gavril Ardelean, Iosif Bereş ***Fauna de vertebrate a Maramureşului***	380	135.000	
14.	Vaier Miclea ***Ecruisarea cu alice***	160	45.000	
15.	Scholtz Bela ***Evaluarea resurselor de muncă din agricultura judeţului Satu Mare şi modalităţi de utilizare a acestora***	352	100.000	

16.	Achim T. Baciu ***Costurile, organizare, planificare, contabilitate, calculaţie, control şi analiză***	302	80.000	
17...	Rodica Frăţilă & co ***Bazele tehnologiei şi merceologiei***	368	125.000	
18.	Mihai Drecin coord. ***Istorie financiar-bancară voi II***	144	55.000	
19.	Sorin Leucuţa ***Tehnologie farmaceutică industrială***	700	210.000	
20	Mircea Alaxândru Birt ***Psihiatrie, prolegomene clinice***	608	260.000	
21.	Dioniziu Moldovan ***Cum aplicăm impozitul pe venitul global conform legislaţiei valabile începând cu 1 ianuarie 2002***	296	120.000	
22.	Gheorghe Funariu ***Chirurgie abdominală***	484	110.000	
23.	Doru Pop ***Introducere în teoria media***	360	290.000	
24.	Nicolae Mărgineanu ***Psihologie şi literatură***	312	115.000	
25.	Sorin E. Leucuţa Biofarmacie şi farmacocinetică	304	190.000	
26.	Francesco Traniello, Gianni Sofii ***II Risorgimento. Scurtă istorie***	128	60.000	

Andrei *C.* Miu
Adrian L Olteanu
De la mecanisme moleculare şi celulare la comportament şi evoluţie
Voi I: Dezvoltarea sistemului nervos
DACIA